

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

18.07.03

REC'D 05 SEP 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 2 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 6 6 5 1 2  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 6 6 5 1 2 ]

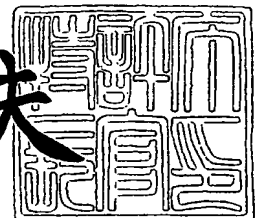
出      願      人            科学技術振興事業団  
Applicant(s):

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年   8 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PS02-1225

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿 2 丁目 1 1 1    A 4 - 3 0 4

    【氏名】 宮本 薫

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿 2 丁目 1 0 0    C 2 - 2 0 6

    【氏名】 山田 一哉

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

    【識別番号】 100087631

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100110249

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 下田 昭

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 011017

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書    1

    【物件名】 図面    1

    【物件名】 要約書    1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 転写制御因子 ZHX3

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は配列番号1で表されるアミノ酸配列の機能部分若しくは該機能部分において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含むアミノ酸配列から成り、転写抑制活性を有するタンパク質又はペプチド。

【請求項2】 前記機能部分が、配列番号1で表されるアミノ酸配列の303～502番目のアミノ酸配列である請求項1に記載のタンパク質又はペプチド。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のタンパク質又はペプチドを有効成分とする、転写抑制を目的とする薬剤。

【請求項4】 肝癌細胞でのみ発現する遺伝子の転写を抑制する請求項1又は2に記載のタンパク質又はペプチド。

【請求項5】 前記遺伝子がII型ヘキソース又はピルビン酸キナーゼMである請求項4に記載のタンパク質又はペプチド。

【請求項6】 請求項4又は5に記載のタンパク質又はペプチドを有効成分とする肝癌の治療薬。

【請求項7】 請求項1又は2に記載のペプチド又はタンパク質を特異的に認識することができる抗体。

【請求項8】 請求項7に記載の抗体を有効成分とする、転写抑制活性を有する薬剤のスクリーニング剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、転写抑制活性を有するタンパク質に関し、より詳細には、肝癌に特異的な遺伝子の転写制御因子ZHX3に関する。

【0002】

**【従来の技術】**

解糖系酵素遺伝子であるピルビン酸キナーゼ（PK）M遺伝子やII型ヘキソキナーゼ（HK II）遺伝子は、正常肝では発現が抑制されているが、肝発癌により誘導される。両者に共通の転写因子は、Nuclear Factor-Y（NF-Y）であるが、正常肝細胞と肝癌細胞におけるNF-Yの発現には差異が認められない。従って、NF-Yと相互作用する因子が肝癌に特異的な遺伝子発現に関与していると考えられる。

そこで、NF-Yで特に重要であるAサブユニット（NF-YA）と相互作用する蛋白質の検索を行ったところ、873個のアミノ酸から成り、2つのジンクフィンガー（Znf）モチーフと5つのホメオドメイン（HD）を有するZHX1をクローニングしてきた（非特許文献1）。ZHX1は、ホメオボックスタンパク質スーパーファミリーのZnfクラスに属し、ヒトZHX1のHD1からHD2領域を含む272～564のアミノ酸配列は、NF-YAのN末端グルタミンーリッチADとの相互作用に必要である（非特許文献1）。このノザンプロット分析を行った結果、ZHX1転写産物が普遍的に発現していることがわかった（非特許文献2, 3）。このヒトZHX1遺伝子は染色体8q上、マーカーCHLC. GATA50B06及びCHLC. GATA7G07の間に局在する（非特許文献2）。発明者らは、このZHX1が転写リプレッサーとして機能し、そして核内に局在することを報告した（非特許文献4）。

**【0003】**

なお、後述する本発明者らが発見した新規な転写制御因子（ZHX3）をコードすると思われる塩基配列を含む配列（GenBank/XM 029734）及びその一部（DDBJ/ AB007855）は既にデータベースに登録されているが、前者はデータベース上で散在していた部分配列をつなげて、推定上の蛋白質として報告されたものであり、蛋白質をコードしている可能性を示唆したに過ぎない。また後者は部分的にクローニングされていた配列であるが、機能解析は行われていなかった。即ち、これら公開された塩基配列のコードするタンパク質が転写抑制活性を有することは全く知られておらず、またこれらの開示情報から推測することも不可能であった。

## 【0004】

## 【非特許文献1】

Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45

## 【非特許文献2】

Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621

## 【非特許文献3】

Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114

## 【非特許文献4】

Yamada, K., Kawata, H., Matsuura, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto, K. (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 279, 368-374

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

発明者らは、ZHX1の生物学的役割を決定することを目的として、ZHX1がNF-YA以外のタンパク質と相互作用し、そして遺伝子転写を制御するかどうかを調べた。そのため、発明者らは、酵母2-ハイブリッドシステムを用いて、ラット肝臓及び卵巣顆粒膜細胞のcDNAライブラリーにおいてZHX1と相互作用するタンパク質の探索を行った。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】

その結果、ZHX1、転写共因子、DNA結合タンパク質、Zyxin、アンドロゲン誘発性アルドース還元酵素のような核タンパク質、11-19リジン-リッチ白血病遺伝子、及びその他の未知のタンパク質がクローニングされ、新規なタンパク質が見出された。この新規タンパク質をコードする全長cDNAの分子クローニング及びヌクレオチド配列を決定したところ、その新規なタンパク質

は 956 アミノ酸残基（配列番号 1）から成り、ZHX1 と同様に、2 つのジンクフィンガー（Znf）モチーフ及び 5 つのホメオドメイン（HDs）を含むことが明らかになった。

発明者らはこの新規なタンパク質が ZHX1 と共に ZHXファミリーを形成することと結論し、そしてそれを ZHX3 と名付けた。ZHXファミリーは、互いにホモダイマーやヘテロダイマーを形成することにより、遺伝子発現の調節に関与していると推察される。

ZHX3 は、ZHX1 及び ZHX3 の両方と二量体を形成するのみでなく、上記 NF-YA の AD とも相互作用する。さらに分析したところ、この ZHX3 は核内に局在する普遍的な転写リプレッサーであり、そして二量体として機能することが明らかになった。

#### 【0007】

即ち、本発明は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の機能部分若しくは該機能部分において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含むアミノ酸配列から成り、転写抑制活性を有するタンパク質又はペプチドである。

ヒトとマウスの ZHX3 のアミノ酸配列を比べると、その相同性は 85.3% であり、ヒトとラット型 ZHX3 のアミノ酸配列の相同性は 87.3% であった。ラット型 ZHX3 のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。このアミノ酸配列はヒト ZHX3 でいうところのアミノ酸配列 114 番から 642 番目までに相当する領域と考えられる。従って、ZHX3 のアミノ酸配列（配列番号 1）と 85% 以上相同のアミノ酸配列を有するタンパク質はヒトの ZHX3 と同一の転写抑制機能を有するタンパク質であると考えられる。

従って、本発明はまた、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列に少なくとも 85% 相同のアミノ酸配列、又は配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の機能部分若しくは該機能部分に少なくとも 85% 相同のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列から成り、転写抑制活性を有するタンパク質又はペプチドと

表すことができる。

後述の実施例でも明らかにされるが、配列番号1のアミノ酸配列の303～502番目のアミノ酸配列はその転写抑制機能を担う部分であるといえる。従って、上記配列番号1で表されるアミノ酸配列の機能部分は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の303～502番目のアミノ酸配列であることが好ましい。

#### 【0008】

肝癌細胞では専ら亢進した解糖系に依存してエネルギー代謝を行っていることから、ZHX3が正常肝では肝癌特異的アイソザム遺伝子群の発現を抑制しており、癌化に伴いZHX3の発現が低下するか、又は、ZHX3蛋白質が修飾されて活性を失うものと考えられる。従って、ZHX3の存在を検出する物質や機能を調節する薬剤を開発することにより、肝癌の診断と治療へ応用することができる。

即ち、本発明は、また、上記のタンパク質又はペプチドを有効成分とする、転写抑制を目的とする薬剤である。更に、本発明は、肝癌細胞でのみ発現する遺伝子の転写を抑制する上記いずれかのタンパク質又はペプチドである。この遺伝子はII型ヘキソース又はピルビン酸キナーゼMであってもよい。また、本発明は、このタンパク質又はペプチドを有効成分とする肝癌の治療薬である。更に、本発明は、このタンパク質又はペプチドを用いて転写抑制因子の欠如に起因する疾患、特に肝癌を治療する方法である。

また、本発明は、上記いずれかのペプチド又はタンパク質を特異的に認識することができる抗体である。更に、本発明は、この抗体を有効成分とする、転写抑制活性を有する薬剤のスクリーニング剤である。

#### 【0009】

##### 【実施例】

本実施例において、酵母2-ハイブリッドシステム、pDsRed1-C1、X- $\alpha$ -gal、ヒト精巢マラソン-レディ cDNA、Advantage2PCRキット、ヒトMultiple Tissue Northern Blot及びBlot II、ExpressHybハイブリダイゼーション溶液、及びpEGFP-C1はClontech(Palo Alto, CA)から購入した。pGEX-4T-2、pGEX-5X-1、 $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP(111TBq/mmol)、グルタチオン-セファロース4B、及び<sup>35</sup>S-メチオニン(37TB

q/mmol)はAmersham Pharmacia Biotech(Cleveland,OH)から購入した。HEK293細胞、ヒト胎児腎細胞系はAmerican Type Culture Collection(Manassas,VA)から購入した。TRIzol試薬、SuperscriptII、pcDNA3.1His-Cプラスミド、及びLIPOFECTAMINE PLUSはInvitrogen(Groningen,Netherlands)から購入した。ExTaqDNAポリメラーゼ、pT7Blue-T2ベクター、及びBcaBestDNAラベリングキットはTaKaRa BIOMEDICALSから入手した。pGEM-T Easyベクター、T7 TNT Quick-結合転写／翻訳系、pGL3-Control、pRL-CMV、及び二重ルシフェラーゼ分析系はPromega(Madison,WI)から購入した。Big Dye terminator FS cycleシーケンシングキットはApplied Biosystems Japan(Tokyo,Japan)から購入した。TOPP3細胞はStragene(La Jolla,CA)から入手した。QIAGENプラスミドキットはQIAGEN(Hilden,Germany)から購入した。

#### 【0010】

本実施例において行った試験の手順を以下に示す。

##### 試験例1 プラスミドの構築

pACT2B1プラスミドを既報に従って作製した(非特許文献1)。

クローン化されたG23プラスミド、pAD-G23をEcoRI/XhoI又はSfiI/BglIIで消化し、それぞれの断片をpGEX-4T-2ベクターのEcoRI/XhoIサイト又はpGBKT7ベクターのSfiI/BamHIサイト中へサブクロニングし、それぞれpGST-G23及びpDBD-G23を得た。

pAD-G23の250bpのEcoRI/HindIII断片をpDsRed1-C1のEcoRI/HindIIIサイト中へサブクロニングし、pDsRed-逆向きG23(HD1)を作製した。上記S-DsRed1C1-HindIII(配列番号3)及び上記A-S-DsRed1C1-SalIオリゴヌクレオチド(配列番号4)をその後、アニーリングし、リン酸化し、そしてpDsRed1-C1のHindIII/SalIサイト中へ挿入し、pDsRed1-C1E1を得た。pDsRed-逆向きG23(HD1)のEcoRI/BglII断片をpDsRed1-C1E1のEcoRI/BamHI中へサブクロニングし、pDsRed-rZHX3(HD1)を作製した。生ずるプラスミドのE



c o R I / X h o I 断片を p A C T 2 の E c o R I / X h o I サイト中へサブクローニングし、p A D - Z H X 3 (242-488) を得た。

p B S II - K I A A 0395 は Dr. Takahiro Nagase (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE, Japan) から賦与された。上記プラスミドの 1.2 kb の S a l I / A p a I 断片を p D s R e d 1 - C 1 E 1 の S a l I / A p a I サイト中へサブクローニングし、p D s R e d - Z H X 3 (HD2-5) を作製した。生ずるものの B g l II / B a m H I 断片を p A C T 2 B 1 の B a m H I サイト中へサブクローニングし、p A D - Z H X 3 (498-903) を得た。

#### 【0011】

p A D - Z H X 1 (142-873)、p A D - Z H X 1 (272-873)、  
p A D - Z H X 1 (565-873)、p A D - Z H X 1 (272-564)、  
p A D - Z H X 1 (272-432)、p A D - Z H X 1 (430-564)、  
p A D - Z H X 1 (345-463)、p D B D、p Y A 1 - 269、p Y A 1 - 140、  
p Y A 1 - 112、p Y A 141 - 269、p Y A 172 - 269、及び p Y A 205 - 269 を既報に従って作製した (非特許文献1、2)

H E K 293 細胞からのトータルRNAを製造業者のプロトコルに従ってT R I Z O L 試薬を用いて調製した。逆転写-ポリメラーゼ鎖反応 (R T - P C R s) を若干の改変を伴って以前に示したように行った (非特許文献2)。ポリメラーゼ鎖反応 (P C R) 条件はE x T a q DNAポリメラーゼの使用を除いては、以前に示した (非特許文献2)。S - h Z H X 3 - A p a I 2 (配列番号5) 及び A s - h Z H X 3 - S T O P 4 (配列番号6)、S - h Z H X 3 - N c o I (配列番号7) 及び A s - h Z H X 3 - B s m B I 2 (配列番号8)、S - h Z H X 3 - M e t (配列番号9) 及び A s - h Z H X 3 - N c o I (配列番号10)、S - h Z H X 3 - H D 1 (配列番号11) 及び A s - h Z H X 3 - H D 2 (配列番号12)、S - h Z H X 3 - H D 1 (配列番号11) 及び A s - h Z H X 3 - 1506 (配列番号13)、S - h Z H X 3 - 1090 (配列番号14) 及び A s - h Z H X 3 - H D 2 (配列番号12)、S - h Z H X 3 - H D 2 (配列番号15) 及び A s - h Z H X 3 - H D 2 (配列番号12)、S - h Z H X 3 - H D 1 (配列番号11) 及び A s - h Z H X 3 - H D 1 (配列番号16)、及びS

—h ZHX3N (配列番号17) 及びAs—h ZHX3N (配列番号18) の組み合わせをプライマーとして用いた。

### 【0012】

これらの生成物を pGEM—T Easy ベクター中へサブクロニングし、それぞれ、pGEM—T Easy ZHX3 (ApaI/STOP)、pGEM—T Easy ZHX3 (NcoI/BsmBI)、pGEM—T Easy ZHX3 (Met/NcoI)、pGEM—T Easy ZHX3 (HD1—2)、pGEM—T Easy ZHX3 (HD1—1506)、pGEM—T Easy ZHX3 (1090—HD2)、pGEM—T Easy ZHX3 (HD2)、pGEM—T Easy ZHX3 (HD1)、及び pGEM—T Easy ZHX3N を得た。

GBKT7MCS1 (配列番号19) 及び GBKT7MCS2 オリゴヌクレオチド (配列番号20) をアニーリングし、リン酸化し、そして pGBKT7 の EcoRI/BamHI サイト中へサブクロニングし、pGBKT7B1 を得た。上記 pGEM—T Easy ZHX3 (ApaI/STOP) の ApaI/BamHI 断片を pDsRed—ZHX3 (HD2—5) の ApaI/BamHI サイト中へサブクロニングし、pDsRed—ZHX3 (HD2—STOP) を得た。pGEM—T Easy ZHX3 (NcoI/BsmBI) の EcoRI/BsmBI 断片を pDsRed—ZHX3 (HD2—STOP) の EcoRI/BsmBI サイト中へサブクロニングし、pDsRed—ZHX3 (NcoI—STOP) を得た。

### 【0013】

S—GBKT7—NdeI (配列番号21) 及び As—GBKT7—NcoI オリゴヌクレオチド (配列番号22) をアニーリングし、リン酸化し、そして pGBKT7B1 の NdeI/NcoI サイト中へ挿入し、pGBKT7NEN を得た。pDsRed—ZHX3 (NcoI—STOP) の 2kb の NcoI/BamHI 断片を pGBKT7NEN の NcoI/BamHI サイト中へサブクロニングし、pGBKT7—ZHX3 (NcoI—STOP) を得た。上記 pGEM—T Easy ZHX3 (Met/NcoI) を NcoI で消化し、96

0bpの断片をpGBKT7-ZHX3 (NcoI-STOP) のNcoIサイト中へサブクロニングし、pDBD-ZHX3 (1-956) を得た。生ずるプラスミドをBamHIで消化し、Klenow反応により平滑末端処理し、そしてその後EcoRIで消化した。上記2.9kbの断片をpGEX-5X-1ベクターのEcoRI/SmaIサイト中へサブクロニングし、pGST-ZHX3 (1-956) を得た。pGST-ZHX3 (1-956) のEcoRI/XhoI断片をpACT2B1のEcoRI/XhoIサイト中へサブクロニングし、pAD-ZHX3 (1-956) を得た。PCRはS-hZHX3HD1 (配列番号11) 及びAs-hZHX3-HD1-Eco (配列番号23) の組み合わせをプライマーとして、pDBD-ZHX3 (1-956) を鋳型として用いて行われた。EcoRIでの消化後、上記断片をpACT2B1のEcoRIサイト中へサブクロニングし、pAD-ZHX3 (303-364) を得た。

#### 【0014】

pSG424、pSG424B1、5×GAL4-pGL3 Control、及びpEGFP-C1E1プラスミドは以前に示された(6、13~15)。pDBD-ZHX3 (1-956) の2.9kbのEcoRI/BamHI断片をpSG424B1又はpEGFP-C1E1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクロニングし、それぞれ、pGAL4-ZHX3 (1-956) 及びpGFP-ZHX3 (1-956) を得た。pDsRed-ZHX3 (HD2-5) のBglII/BamHI断片をpSG424B1のBamHIサイト中へサブクロニングし、pGAL4-ZHX3 (498-903) を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (HD1-2)、pGEM-T Easy ZHX3 (HD1-1506)、pGEM-T Easy ZHX3 (1090-HD2)、及びpGEM-T Easy ZHX3 (HD2) のEcoRI/BamHI断片をpSG424B1又はpEGFP-C1E1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクロニングし、それぞれ、pGAL4-ZHX3 (303-555)、pGAL4-ZHX3 (303-502)、pGFP-ZHX3 (303-555)、pGFP-ZHX3 (303-502)、pG

FP-ZHX3 (364-555)、pGFP-ZHX3 (497-555)を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (HD1) のEcoRI/BamHI断片をpSG424B1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクロニングし、pGAL4-ZHX3 (303-364)を得た。

#### 【0015】

PCRはS-hZHX3-Met3 (配列番号24) 及びAs-hZHX3-909 (配列番号25)、S-hZHX3-Met3 (配列番号24) 及びAs-hZHX3-435 (配列番号26)、S-hZHX3-436 (配列番号27) 及びAs-hZHX3-909 (配列番号25)、S-hZHX3-Met3 (配列番号24) 及びAs-hZHX3-321 (配列番号28)、S-hZHX3-322 (配列番号29) 及びAs-hZHX3-435 (配列番号26)、及びS-hZHX3-1663 (配列番号30) 及びAs-hZHX3-BsmBI-2 (配列番号31) の組み合わせをプライマーとして、pDBD-ZHX3 (1-956) を鋳型として用いて、そしてS-hZHX3-1090 (配列番号14) 及びAs-hZHX3-1506 (配列番号13) の組み合わせをプライマーとして、pGFP-ZHX3 (303-555) を鋳型として用いて行われた。増幅されたDNAもpGEM-T Easy又はpT7Blue-2 Tベクター中へサブクロニングし、pGEM-T Easy ZHX3 (Met/909)、pGEM-T Easy ZHX3 (Met/435)、pGEM-T Easy ZHX3 (436/909)、pT7Blue-2 T ZHX3 (Met/321)、pT7Blue-2 T ZHX3 (322/435)、pGEM-T Easy ZHX3 (1663/2022)、及びpGEM-T Easy ZHX3 (1090/1506) をそれぞれ得た。これらのプラスミドのEcoRI/BamHI断片をpSG424B1又はpEGFP-C1E1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクロニングし、pGAL4-ZHX3 (1-145)、pGAL4-ZHX3 (146-303)、pGFP-ZHX3 (1-303)、pGFP-ZHX3 (1-107)、pGFP-ZHX3 (108-145)、及びpGFP-ZHX3 (146-303) をそれぞれ得た。pGEM-T Easy ZHX3 (1090/1

506) のEcoRI/BamHI断片をpSG424B1のEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGAL4-ZHX3 (364-502) を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (1663/2022) のEcoRI/BsmBI断片をpDsRed-ZHX3 (HD2-STOP) のEcoRI/BsmBIサイト中へサブクローニングし、pDsRed-ZHX3 (1663-STOP) を得た。生ずるプラスミドのEcoRI/BamHI断片をpEGFP-C1E1のEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGFP-ZHX3 (555-956) を得た。

#### 【0016】

HisCMCS1 (配列番号32) 及びHisCMCS2オリゴヌクレオチド (配列番号33) をアニーリングし、リン酸化し、そしてpcDNA3.1His-CのKpnI/EcoRIサイト中へサブクローニングし、pcDNA3.1His-C2を得た。上記pGST-ZHX1 (272-432) は以前に示された(12)。pGST-ZHX1 (272-432) の480bpのBamHI断片をpcDNA3.1His-C2のBamHIサイト中へサブクローニングし、pCMV-ZHX1 (272-432) を得た。

以上全てのプラスミドのヌクレオチド配列をDNAシーケンサー3100 (Applied Biosystems)を用いて確認した。

#### 【0017】

#### 試験例2 ライブラリースクリーニング

酵母転写因子GAL4のDNA結合ドメイン(DBD)に融合した、ヒトZHX1の全コード配列を発現する、pDBD-ZHX1 (1-873) (pGBK T7-ZHX1 (1-873))、及びラット顆粒膜細胞及び肝cDNAライブラリーの構築は既報に従って行った(非特許文献3等)。AH109酵母細胞を上記pDBD-ZHX1 (1-873) プラスミドで形質転換した。上記株はcDNAライブラリーをスクリーニングするためのおとりとして使用された。TE/LiAc-に基づいた高効率形質転換法がライブラリースクリーニングに使用された(Yamada, K., Wang, J.-C., Osawa, H., Scott, D. K., and Granner, D. K. (1998) BioTechniques 24, 596-600)。肝及び顆粒膜細胞cDNAライブ

ラリーの1500万及び1100万の独立のクローンがそれぞれ、4 mM 3-アミノトリアゾール及びX- $\alpha$ -galで補充された、ヒスチジナー、トリプトファン、ロイシナー、及びアデニナーなしの合成デキストロースプレート上にプレートされた。33及び109の陽性クローンがそれぞれ第一形質転換体から得られた。量化可能なlacZレポーターを含む、上記酵母株SFY526、及びpGBKT7又はpDBD-ZHX1 (1-873) プラスミドのいずれかを、第一スクリーニング又は親ベクター、pACT2における陽性クローンから単離されたプラスミドで形質転換した。第二スクリーニングでは、肝及び顆粒膜細胞cDNAライブラリーの、それぞれ、16及び25のクローンが再現可能な高 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を特に示した。o-ニトロフェニル $\beta$ -D-ガラクトシドを用いる、計量可能な $\beta$ -ガラクトシダーゼ分析を、既報に示されたように

(非特許文献1、2等)、浸透された細胞について行った。それぞれの陽性クローンからのヌクレオチド配列をBLAST配列探索及び比較プログラムを用いてGenBankデータベース内に入っているものと比較した。

#### 【0018】

##### 試験例3 cDNA末端の高速増幅(RACE)

ヒトZHX3 cDNAの5'末端を得るために、ヒト精巣マラソンレディ cDNA及びAdvantage 2 PCRキットを用いて5'-RACE法を使用した。2つの遺伝子特異的プライマー、hZHX3-5 RACE-As1 (配列番号34)、及びhZHX3-5 RACE-As2 (配列番号35)を使用した。上記5'-RACE手順は製造業者が推奨するプロトコルに従って行われた。増幅されたDNA断片をpGEM-T Easyベクター中にサブクロニングし、そしてそれらのヌクレオチド配列を決定した。

#### 【0019】

##### 試験例4 Poly(A)+RNAプロット分析

ヒトMultiple Tissue Northern Blot及びBlot IIを、pGEM-T Easy hZHX3N プラスミドから単離された、ヒトZHX3 cDNAの0.6 kbの $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP-標識cOR

I断片とハイブリダイゼーションし、そしてBcaBest DNA標識キットで標識した。ExpressHybハイブリダイゼーション溶液を前ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションに使用した。前ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション及び洗浄の手順は供給者により提供されるプロトコルに従って行われた。

### 【0020】

#### 試験例5 酵母2-ハイブリッドシステム及び液体 $\beta$ -ガラクトシダーゼ分析

ZHX3とのZHX1のヘテロ二量体化ドメインを分析するために、pDBD又はpDBD-G23を含むSFY526酵母株を、GAL4 ADを融合したZHX1のさまざまな切り取られた形態、又はpACT2で形質転換した。ZHX1とのZHX3のヘテロ二量体化ドメイン又はZHXのホモ二量体化ドメインをマッピングするために、pDBD、pDBD-ZHX1(1-873)又はpDBD-G23を含むSFY526酵母株を、GAL4 ADを融合したZHX3のさまざまな切り取られた形態、又はpACT2で形質転換した。ZHX3のNF-YAとの相互作用ドメインを調べるために、pDBD又はpYA1-269を含むSFY526酵母株を、GAL4 ADに融合されたZHX3のさまざまな切り取られた形態で形質転換した。NF-YAのZHX3との相互作用ドメインをマッピングするために、pAD-ZHX3(242-488)を含むSFY526酵母株を、GAL4 DBDに融合されたNF-YAのさまざまな切り取られた形態で形質転換した。

これらの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は既報(非特許文献1、2、3)に示されたように、決定された。

### 【0021】

#### 試験例6 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)プルダウン分析

pGST-ZHX1(1-873)プラスミドを既報に従って作製した(非特許文献3)。TOPP3細胞をpGEX-5X-1、pGST-ZHX1(1-873)、pGST-G23又はpGST-ZHX3(1-956)融合タンパク質発現プラスミドで形質転換した。上記GST融合タンパク質の調製、in vitroで翻訳されたZHX1の<sup>35</sup>S-標識及びプルダウン分析は以前に示された(

非特許文献2、3)。上記pDBD-ZHX3(1-956)プラスミドをin vitroで翻訳された、35S-標識された、ZHX3の調製のために使用した。最後に、ビーズを等体積の2×SDSサンプル緩衝液に再懸濁し、そしてそれぞれの上清を前染色分子量マーカーと共に、10%SDS-PAGEゲルにのせた。上記ゲルを乾燥させ、そしてFUIX画像化プレート(Kanagawa, Japan)に露出した。相互作用シグナルをFUIX BAS-2000画像分析システムを用いて検出した。それぞれの融合タンパク質の比較の純度及び量はクマシーブリリアントブルーR-250でのゲル染色により決定された。

### 【0022】

#### 試験例7 細胞培養及びDNAトランスフェクション

HEK293細胞を10%ウシ胎児血清で補充したDulbecco's modified Eagles medium中で37℃で5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養した。

DNAトランスフェクションはLIPOFECTAMINE PLUS試薬を用いて行われた。トランスフェクションに使用された全てのプラスミドはQIAGENプラスミドキットを用いて調製され、続いてCsCl勾配超遠心分離を行った。細胞(ウェル当たり5×10<sup>4</sup>)をトランスフェクションの前日に24ウェルプレート中で接種した。上記5×GAL4-pGL3 Controlは既報に従って作製した(Tanaka, T., Inazu, T., Yamada, K., Myint, Z., Keng, V. W., Inoue, Y., Taniguchi, N., and Noguchi, T. (1999) Biochem. J. 339, 111-117)。5×GAL4-pGL3 Control又はpGL3-Controlはレポータープラスミドとして使用された。ZHX3の転写活性の決定のために、100ngのレポータープラスミド、2ngのpRL-CMW、及び示された量のGAL4 DBD-ZHX3融合タンパク質発現プラスミドをトランスフェクトした。プラスミドの総量(152ng)を、必要であれば、pSG424の添加により調節した。ZHX3のZHX1とのヘテロ二量体化の、ZHX3の転写活性への効果の分析のために、100ngのレポータープラスミド、2ngのpRL-CMW、50ngのGAL4 DBD融合タンパク質発現プラスミド、及び示された量のヒトZHX1の二量体化ドメインの発現プラスミド、pCMV-ZHX1(272-432)をトランスフェクトした。プラスミドの総



量(202 ng)を、必要であれば、p cDNA3.1His-C2の添加により調節した。緑色蛍光タンパク質(GFP)－融合タンパク質の観察のために、300 ngの示されたGFPプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクション3時間後、培地を変えた。48時間後、上記細胞をルシフェラーゼ分析にかけ又はLaser microscope(Olympus)で観察した(15)。ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ分析を製造業者の推奨するプロトコル(Promega)に従って行った。ルシフェラーゼ活性をBerthold Lumat model LB 9501(Wildbad, Germany)により決定した。ホタルルシフェラーゼ活性(比較光単位)をウミシイタケルシフェラーゼ活性により正規化した。

### 【0023】

#### 実施例1

本実施例では、ZHX1による転写抑制の分子メカニズムを分析し、ヒトZHX1が既知の又は新規の転写因子と相互作用するかという問題を調べるために、ZHX1相互作用タンパク質のスクリーニングを行った。ヒトZHX1の全コード配列をGAL4 DBDに融合し、そしてこのキメラタンパク質を酵母2-ハイブリッドシステム(試験例5)を用いてラット肝及び顆粒膜細胞cDNAライブラリーをスクリーニングするためのおとりとして使用した(試験例2)。それぞれのライブラリーの約 $1.5 \times 10^7$ 及び $1.1 \times 10^7$ の独立のクローンをスクリーニングし、そして16及び25クローンが再現可能なHis<sup>+</sup>、Ade<sup>+</sup>、及び $\alpha$ -gal陽性特性をそれぞれ示した。これらのクローンからGAL4 AD融合タンパク質をコードするプラスミドを単離した。それらのヌクレオチド配列の決定後、それらをBLAST探索プログラムを用いてGenBankデータベースと比較した。その結果を表1に示す。

### 【0024】

【表 1】

The ZHX1-interacting proteins

Protein	Number of clone
BS69 corepressor	9
Nuclear protein, ataxia-telangiectasia-like protein	5
Androgen-induced aldose reductase	3
ATF-IP	2
Spinocerebellar ataxia type I	2
Zyxin	2
Elf-1	1
Eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene	1
ZHX1	8
unknown	8

## 【0025】

表1に示すように、BS69共リプレッサー、核タンパク質、毛細血管拡張性運動失調様タンパク質、アンドロゲンで誘発されるアルドース還元酵素、活性化転写因子(ATF)相互作用タンパク質(ATF-IP)、脊髄小脳性運動失調I型、ジキシン、Elf-1、11-19リジン-リッチ白血病遺伝子、及びZHX1が既知のタンパク質としてクローニングされた(非特許文献3等)。8クローンは未知のタンパク質をコードした。興味深いことに、3クローン、G23、G58、及びL26はZnf及びHDモチーフの両方をコードした。詳細なヌクレオチド配列分析は、G23のヌクレオチド配列がG58のそれに含まれており、そして上記ヌクレオチド配列ははじめにクローニングされたヒトKIAA0395 cDNAのそれと相似性を示したことを示した。発明者らはこの研究においてこれらのクローンの分析に焦点をおいた。KIAA0395とは異なる上記L26クローンはZHX2として他の報告において現れるであろう。

次に、ヒトKIAA0395 cDNAの5' -非コード配列及び残りのコード領域を単離するために、5' -RACE法(試験例3)を用いた。遺伝子特異的プライマー及びアダプタープライマーの組み合わせを用いて、cDNA断片をヒ

ト精巢マラソン cDNA を鋳型として PCR により得た。最後に、全長 cDNA の大きさが 9,302 bp であることが決定された。

#### 【0026】

非常に興味深いことに、全長 cDNA は 965 アミノ酸残基のオープンリーディングフレームを有し、そしてそのタンパク質の推定されたアミノ酸配列は ZHX1 に加えて 2 つの Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-型 Zn<sup>2+</sup>モチーフ及び 5 つの HD を含む。このアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。発明者らはこのタンパク質を ZHX3 と呼ぶ。記号 ZHX3 は、ジンクフィンガー及びホメオボックス 3 の名前から、HUGO Nomenclature Committee に提示された。図 1 にこのヒト ZHX3 の推測されるアミノ酸配列のヒト ZHX1 との比較を示す。

このヒト ZHX3 タンパク質は予測された分子量 104.7 キロダルトン及び等電点 5.68 を有する。上記 pAD-G58 及び pAD-G23 がそれぞれ ZHX3 の 114～642 の及び 242～615 のアミノ酸配列をコードする一方で、上記 KIAA0395 はヒト ZHX3 の 498～956 のアミノ酸配列をコードする。転写制御ドメインとして働きうるグルタミン酸-リッチ領域は 670～710 のアミノ酸配列中に存在し、そして推定される核移行シグナルは存在しない。ZHX3 及び ZHX1 の間のコード領域におけるヌクレオチド配列及びアミノ酸配列における相同性は、それぞれ 46.9% 及び 34.4% であった。

#### 【0027】

次に、ヒト ZHX3 mRNA の組織分布をノザンブロット分析（試験例 4）により決定した。図 2 に示すように、ヒト ZHX3 mRNA は複数のバンド、長さ 9.4、7.3、5.0、及び 4.6 kb として検出された。発明者らのクローニングされた挿入物の大きさは 9,302 bp であったので、それは最長の転写物とほぼ同じである。強さは組織間でさまざまであったが、これらの転写物は調べた全ての組織において観察された。このことはヒト ZHX3 mRNA は普遍的に発現されることを示している。

#### 【0028】

#### 実施例 2

本実施例では、ZHX1 のどのドメインが ZHX3 との相互作用に必要とされ

るかという問題を調べるために、ZHX1及びZHX3の間の最小ヘテロ二量体化ドメインのマッピングを行った。酵母株SFY526を、GAL4 DBDのみを発現するpDBD又はGAL4 DBDに融合されたZHX3のアミノ酸残基242～615をコードするpDBD-G23で形質転換した。上記2つの酵母株はレポーター酵母として使用された。GAL4 ADのみを発現するpACT2又はGAL4 ADに融合されたZHX1のさまざまな切断された形態をコードするいくつかのプラスミドは獲物プラスミドとして使用された。pDBDを含むレポーター酵母をこれらの獲物プラスミドで形質転換したとき、それらは低 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した（データは示していない）。さらに、pDBD-G23を含むレポーター酵母をpACT2、pAD-ZHX1（565-873）、pAD-ZHX1（430-564）又はpAD-ZHX1（345-463）で形質転換したとき、これらの酵母も低 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した（図3）。対照的に、上記酵母をpAD-ZHX1（142-873）、pAD-ZHX1（272-873）、pAD-ZHX1（272-564）又はpAD-ZHX1（272-432）で形質転換したとき、高 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が観察された。上記pAD-ZHX1（272-432）はZHX1の242～432のアミノ酸残基をコードする。

#### 【0029】

次に、ZHX3のどのドメインがZHX1との相互作用に必要とされるかの問題を決定した。酵母株SFY526を、GAL4 DBDに融合されたZHX1の全コード配列をコードするpDBD-ZHX1（1-873）又はpDBDで形質転換した。上記2つの酵母株はレポーター酵母として使用された。上記pACT2又はGAL4 ADに融合されたZHX3のさまざまな切断された形態をコードするいくつかのプラスミドは獲物プラスミドとして使用された（図4）。pDBDを含むレポーター酵母をこれらの獲物プラスミドで形質転換したとき、それらは低 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した（データは示していない）。これらの酵母はpDBD-ZHX1（1-873）を含むレポーター酵母をpAD-G23又はpAD-ZHX3（242-488）で形質転換したときのみ、高 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。上記pAD-ZHX3（242-488）は

ZHX3の242～488のアミノ酸残基をコードする。

これらの結果はZHX1及びZHX3はHD1を含むそれぞれの領域を通してヘテロ二量体化することを示す。

### 【0030】

次に、ZHX1及びZHX3の間の特異的相互作用を実証するためにin vitro GSTプルダウン分析（試験例6）を行った。発明者らは4つのプラスミド、GSTのみを発現するpGEX-5X-1、GSTに融合されたヒトZHX3の242～615のアミノ酸配列をコードするpGST-G23、GSTに融合されたヒトZHX3タンパク質の全コード領域を発現するpGST-ZHX3（1-956）、及びGSTに融合されたヒトZHX1タンパク質の全コード領域を発現するpGST-ZHX1（1-873）をそれぞれ使用した。これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、そしてグルタチオンセファロースビーズに固定した。上記in vitroで翻訳した、<sup>35</sup>S-標識した、全長ヒトZHX1は、GST-G23及びGST-ZHX3（1-956）に結合するが、GSTのみには結合しないことがわかった（図5、レーン3及び6）。さらに、上記in vitroで翻訳した、<sup>35</sup>S-標識した、全長ヒトZHX3はGST-ZHX1（1-873）に結合するが、GSTのみには結合しないことがわかった（図5、レーン9）。対照的に、プログラム化されていない網状赤血球溶解物は上記タンパク質のいずれにも結合しなかった（データは示していない）。

これらの結果は、ZHX1はin vivo及びin vitroの両方で、ZHX3とヘテロ二量体を形成することができることを示す。

### 【0031】

#### 実施例3

本実施例では、ZHX1はホモ二量体を形成するので、酵母2-ハイブリッドシステム（試験例5）を用いてZHX3のホモ二量体の形成を調べるために、ZHX3の最小ホモ二量体化ドメインのマッピングを行った。pDBD又はpDBD-G23を含む2つのSFY526酵母株をレポーター酵母として使用した。発明者らはさまざまな獲物プラスミド、pACT2、pAD-G23、及びpAD-ZHX3（242-488）、pAD-ZHX3（303-364）、及び

pAD-ZHX3 (498-903) をそれぞれ調製した。これらのプラスミドをレポーター酵母に形質転換し、そして $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をそれぞれの場合において決定した(図6)。pDBDを含むレポーター酵母を上記プラスミドで形質転換したとき、それらは低 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した(データは示していない)。さらに、pDBD-G23を含むレポーター酵母をpACT2、pAD-ZHX3 (303-364)、及びpAD-ZHX3 (498-903) で形質転換したときも、非常に低い $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出された。対照的に、pAD-G23又はpAD-ZHX3 (242-488) で形質転換した酵母は高 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。これらの結果は、ZHX3は242~488の領域を介してホモ二量体を形成することができることを示す。

次に、ZHX3のホモ二量体化を実証するためにin vitro GSTプルダウン分析を行った。発明者らは2つのプラスミド、pGEX-5X-1及びpGST-ZHX3 (1-956) をそれぞれ使用した。これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、そしてグルタチオン-セファロースビーズに固定した。上記in vitroで翻訳された、<sup>35</sup>S-標識された、全長ヒトZHX3はGST-ZHX3 (1-956) に結合するがGSTのみには結合しないことがわかった(図7)。対照的に、プログラム化されていない網状赤血球溶解物は上記タンパク質のいずれにも結合しなかった(データは示していない)。これらの結果は、ZHX3はin vivo及びin vitroでホモ二量体を形成することができることを示す。

#### 【0032】

##### 実施例4

本実施例では、ZHX3がNF-YAのADとも相互作用することを調べた。

ヒトZHX1ははじめにNF-YAと相互作用するタンパク質としてクローニングされた(非特許文献2)。本実施例では、ZHX3のNF-YAとの相互作用を酵母2-ハイブリッドシステム(試験例5)を用いて調べた。発明者らはそれぞれpDBD又はpYA1-269で形質転換した2つのレポーター酵母株を使用した。上記pYA1-269はGAL4 DBDと融合したNF-YAのADを発現する。上記pACT2、pAD-G23、pAD-ZHX3 (498-

903)、pAD-ZHX3(242-488)、pAD-ZHX3(303-364)、及びpAD-ZHX3(1-956)をレポーター酵母株に形質転換し、そしてそれらの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を決定した。pDBDを含むレポーター酵母をこれらのプラスミドで形質転換したとき、それらの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性はかなり低いことがわかった(データは示していない)。図8中に示すように、pYA1-269を含むレポーター酵母をpACT2、pAD-ZHX3(498-903)又はpAD-ZHX3(303-364)で形質転換したときも、それらの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性低かった。しかしながら、上記酵母をpAD-G23、pAD-ZHX3(1-956)又はpAD-ZHX3(242-488)で形質転換したとき、高い値の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出された。これらの結果は、ZHX3はNF-YAのADと相互作用し、そして残基242~488のアミノ酸配列がこの相互作用に重要であることを示す。

次に、酵母2-ハイブリッドシステム(試験例5)を用いてNF-YAのZHX3との最小相互作用ドメインを同定した。図9に示すように、NF-YAのADはそれぞれグルタミン-リッチ及びセリン/スレオニン-リッチドメインから成る。pAD-ZHX3(242-488)を含むSFY526酵母株がレポーター酵母として使用された。GAL4-DBDに融合されたNF-YAの切断された形態を発現する、さまざまなプラスミドを上記酵母に形質転換し、そしてそれらの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を決定した。その結果、どちらもNF-YAの141~269のアミノ酸配列を含む、pYA1-269又はpYA141-269を含む酵母のみが高い値の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示した。これらの結果は、NF-YAのセリン/スレオニン-リッチADはZHX3との最小相互作用ドメインを表すことを示す。

### 【0033】

#### 実施例5

本実施例では、ZHX3が転写リプレッサーであることを確認するために、哺乳類のワンハイブリッドシステム(試験例7)を用いてZHX3の転写の役割を決定した。GAL4-結合部位の5つのコピーがpGL3-ControlのSV40プロモーターの上流に挿入された、上記5×GAL4-pGL3Cont

r o l プラスミドを、レポータープラスミドとして使用された (14)。2つのエフェクタープラスミド、GAL4 DBDのみを発現する pSG424、及び GAL4 DBDのC末端に融合されたヒト ZHX3 の全コード領域を発現する pGAL4-ZHX3 (1-956) を調製した。図10及び図11に示すように、5×GAL4-pGL3Control 及びさまざまな量の pGAL4-ZHX3 (1-956) を HEK293 細胞中に共トランスフェクトしたとき、上記ルシフェラーゼ活性は用量依存的な様式で減少された。上記最高阻害は 50 ng の pGAL4-ZHX1 (1-956) で得られた。対照的に、GAL4-結合部位の5つのコピーを欠く上記 pGL3-Control を pSG424 又は pGAL4-ZHX3 (1-956) でトランスフェクトしたとき、上記ルシフェラーゼ活性は変化しなかった (図10)。これらの結果は、上記 GAL4-ZHX3 融合タンパク質は GAL4 結合部位依存的な様式でルシフェラーゼ活性を減少させることを示し、ZHX3 は転写リプレッサーとしてはたらくことを示す。

発明者らはその後 ZHX3 の ZHX1 とのヘテロ二量体化はその転写リプレッサー活性に必要であるかどうかの問題を調べた。発明者らは、ZHX1 の 272 ~ 423 のアミノ酸配列が発現される、pCMV-ZHX3 (272-432) を調製した。この領域は ZHX1 の ZHX3 との二量体化ドメインと一致するが、ZHX1 のリプレッサードメインは含まない (Yamada, K., Kawata, H., Matsura, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto, K. (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 279, 368-374)。従って、このタンパク質の過剰発現は ZHX1 のドミナントネガティブ形として機能する。上記プラスミドを上記分析システムにおいて共トランスフェクトしたとき、上記ルシフェラーゼ活性は用量依存的な様式で増加された (図11)。対照的に、p cDNA3.1HisC-2 の共トランスフェクトはルシフェラーゼ活性に全く影響しなかった。これらの結果は、ZHX3 の ZHX1 とのヘテロ二量体化はリプレッサー活性の必要条件であることを示す。

#### 【0034】

最後に、ZHX3 の最小リプレッサードメインを決定するために、上記 5×G



AL4-pGL3Controlをさまざまなプラスミド、pGAL4-ZHX3 (1-145)、pGAL4-ZHX3 (146-303)、pGAL4-ZHX3 (303-555) 又はpGAL4-ZHX3 (498-903) でトランスフェクトした(図12)。残基303~555のアミノ酸配列を発現するpGAL4-ZHX3 (303-555) のみが、ルシフェラーゼ活性における減少を引き起こした。

より詳細な分析のために、発明者らはエフェクタープラスミド、pGAL4-ZHX3 (303-502)、pGAL4-ZHX3 (303-364) 又はpGAL4-ZHX3 (364-502) を調製した。pGAL4-ZHX3 (303-502) を上記レポータープラスミドでトランスフェクトしたときのみ、上記ルシフェラーゼ活性は減少された(図12)。これらの結果は、ZHX3の残基303~502のアミノ酸配列はリプレッサー活性に重要であることを示す。

#### 【0035】

#### 実施例6

本実施例では、ZHX3タンパク質の細胞内局在を調べるために、GFP-ZHX3融合タンパク質発現系を使用して、ZHX3の細胞内局在の決定及び核移行シグナル(NLS)のマッピングを行った。このため、GFPに融合したZHX3のさまざまな切断された形態を調製した。これらのプラスミドをHEK293細胞中にトランスフェクトし、そしてGFP融合タンパク質の細胞内局在を観察した。GFPタンパク質のみをコードするpEGFP-C1E1は細胞全体において観察された(図13)。対照的に、全長ZHX3がGFPのC末端に融合されたGFP-ZHX3 (1-956) は核内に局在した。ZHX3のNLSを決定するために、さまざまなプラスミドをトランスフェクトした。pGFP-ZHX3 (1-303)、pGFP-ZHX3 (303-555)、及びpGFP-ZHX3 (555-956) をトランスフェクトしたとき、pGFP-ZHX3 (1-303) 及びpGFP-ZHX3 (303-555) の両方が核内に局在した。対照的に、pGFP-ZHX3 (555-956) をトランスフェクトしたとき、上記タンパク質は核外に局在した。これらの結果は、ZHX3は2つ

のNLS及び核輸出シグナル(NES)を含むことを示す。最小のNLSsをマッピングするために、さまざまなプラスミドを構築した。3のプラスミド、pGFP-ZHX3(1-107)、pGFP-ZHX3(364-555)、及びpGFP-ZHX3(497-555)をトランスフェクトしたときのみ、ZHX3の核局在が観察された。これらの結果は、ZHX3はGFP融合タンパク質として核内に局在することができ、そしてZHX3の2つのNLSはそれぞれ1-107、及び497-555のアミノ酸配列に位置することを示す。

### 【0036】

#### まとめ

上記実施例にて、ZHX-1相互作用タンパク質の探索を行い、主にそれらのうち新規転写リプレッサーZHX3を分析し、そしてその機能ドメインをマッピングした。ZHX3の最小機能ドメインは図14に要約される。ZHX1はもちろん、ZHX3は2つのZnfモチーフ及び5つのHDを含み、ホモ二量体を形成し、NF-YAのADと相互作用し、そして核内に局在する。さらに、ZHX3 mRNAは普遍的に発現される。この発見から、発明者らは、ZHX1及びZHX3の両方が同じファミリー、すなわち、ZHXファミリーの構成員であることを結論づけた。ZHX1及びZHX3の全アミノ酸配列の相同性は34.4%であったが、上記2つのZnfモチーフ及び5つのHDは高く保存されていた。ZHX1及びZHX3の間のZnf1、Znf2、HD1、HD2、HD3、HD4、及びHD5のアミノ酸配列における相同性は、それぞれ50.0、45.5、61.7、50.0、53.3、43.3、及び33.3%であった。上記HD4は他のドメインよりも非常に低い相同性を示した。独特のグルタミン酸-リッチ酸性領域がZHX3の残基670-710のアミノ酸配列中に局在する(図1及び9)。一般的に、上記Znfモチーフ、HD、及び酸性領域は転写因子の機能特性に責任がある。例えば、60アミノ酸から成る、上記Znfモチーフ及びHDの両方は同族のDNA配列に結合するのに必要とされ、上記グルタミン酸-リッチ領域は転写活性に関係し、そして塩基性領域は上記DBD又はNLSである(Gehring, W. J., Affolter, M., and Burglin, T. (1994) Annu. Rev. Biochem. 63, 487-526 等)。

## 【0037】

ZHX3はZHX1とヘテロ二量体を形成するのみでなく、ホモ二量体をも形成する。ZHX3の242～488のアミノ酸配列はこれらの二量体化に必要及び十分である(図3～7)。ZHX1のZHX3とのホモ及びヘテロ二量体化の最小ドメインはZHX1の272～432のアミノ酸配列にマッピングされた(図3～5)。これらの領域はHD1を含むが、HD1のみは二量体化できない(図3～9)。HD1を含むより広範な領域が二量体化に必要とされる。さらに、ZHX3及びZHX1の両方がNF-YAのADと相互作用する；前者は上記NF-YAのセリン／スレオニン－リッチADと、そして後者はグルタミン－リッチADとそれぞれ相互作用する(図8, 9)。ZHX3のNF-YAのADとの相互作用ドメインはZHX3の二量体化ドメインと同じ領域にマッピングされた(図8, 9)。対照的に、ヒトZHX1のHD1～HD2領域を含む272～564のアミノ酸配列はその相互作用に必要とされる(非特許文献1)。ZHX1のZHX3とのヘテロ二量体複合体がNF-YAの異なるADと相互作用するかどうかの問題は決定されないままである。

## 【0038】

ZHX3は転写リプレッサーである(図10～12)。ZHX3の最小リプレッサードメインは二量体化及び相互作用ドメインの両方と重なる領域にマッピングされる。興味深いことに、ZHX1のヘテロ二量体化ドメインの過剰発現は、リプレッサー活性には責任はないが、ZHX3のリプレッサー活性における減少を引き起こした(図11)。このことは、ZHX3は本質的にリプレッサー活性をもたず、そして上記観察された活性は二量体化のパートナーである、リプレッサードメインが酸性領域のC末端に局在する(Yamada, K., Kawata, H., Matsuu ra, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sek iguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto. K. (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 279, 368-374) ZHX1のリプレッサー活性に因るものであることを示唆する。しかしながら、ZHX3の二量体化ドメインは真実にリプレッサー活性を有することを証明することはできない。ZHX3がDNA結合タンパク質であるかどうかは明らかでない。その結果として、HD1領域を含むZHX3の領域

は多面発現性のドメイン；ホモ及びZHX1とのヘテロ二量体化ドメイン、NF-YAのADとの相互作用ドメイン、及びリプレッサードメインであるように見える。

### 【0039】

転写制御領域は転写リプレッサーとして機能するために共因子と相互作用する (Hu, X., and Lazar, M. A. (2000) Trends Endocrinol. Metab. 11, 6-10 等)。これらの共因子はmSin3A/B、ヒストンデアセチレース、及び受容体転写の核共リプレッサー (N-CoR) /サイレンシング仲介物質を含む。ZHX1相互作用タンパク質として、発明者らは2つの共リプレッサー、BS69及びATF-IP (表1) をクローニングした (Hateboer, G., Gennissen, A., Ramos, Y. F. M., Kerkhoven, R. M., Sonntag-Buck, V., Stunnenberg, H. G., and Bernards, R. (1995) EMBO J. 14, 3159-3169 等)。BS69ははじめに289Rアデノウイルスタイプ5 E1Aタンパク質のADと直接相互作用するタンパク質として同定された。BS69は、少なくとも部分的には、BS69のMYNDドメインの共リプレッサーN-CoRとの相互作用を通して、抑制を仲介することも報告されている (Masselink, H., and Bernards, R. (2000) Oncogene 19, 1538-1546)。対照的に、ATF-IPは、RNAポリメラーゼIIホロエンザイムを含む、基本の転写機構 (TFII E及びTFII H) のいくつかの成分と相互作用する (DeGraeve, F., Bahr, A., Chatton, B., and Keding, C. (2000) Oncogene 10, 1807-1819)。ZHX1及びZHX3が転写リプレッサーとしてはたらくとき、これらの共リプレッサーと相互作用することができ、それゆえ遺伝子転写を抑制する。

### 【0040】

さらに、ZHX1及びZHX3の両方はNF-YA相互作用タンパク質である。NF-Yは共アクチベーター、p300及びp300/環状AMP応答エレメント-結合タンパク質-結合タンパク質-関連因子 (P/CAF) と関連することが報告されている (Mantovani, R. (1999) Gene 239, 15-27)。特に、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を伴うP/CAFはNF-YAと相互作用し、転写的に活性なNF-Y複合体を形成する (Mantovani, R. (1999) Gene 239,

15-27)。それゆえ、ZHX1、ZHX3、及びNF-YA間の相互作用の組み合わせはNF-Yの転写活性に影響するようである。例えば、ZHX1又はZHX3のどちらか、又は両方は、P/CAFの上記NF-Yとの関連を高め又は妨害することができ、それゆえNF-Y活性を制御する。さらに、共リプレッサーを伴う転写リプレッサー、ZHXファミリーの構成員は、上記NF-YAと直接関連することができ、それゆえ、NF-Y活性を阻害する。どちらの場合においても、ZHXタンパク質がいくつかのNF-Y制御可能な遺伝子の制御に参加する可能性がある。

#### 【0041】

ZHX3 mRNAは普遍的に発現されるが、骨格筋、腎臓、及び精巣においてより高く発現されることがわかった(図2)。ZHX3 mRNAの大きさはノザンプロット分析により決定されるように複数であった。クローニングされた挿入物は9,302bpを含み、そして上記大きさはZHX3の最も大きな転写物と同じである。ヒトZHX3遺伝子の探索がヒトゲノムプロジェクトにより編集されたデータベースを用いて行われたとき、それは染色体20qに局在することがわかった。このことは、ZHX3遺伝子はハプロイドヒトゲノム当たり単一のコピーとして存在することを示す。ZHX3 cDNAのヌクレオチド配列は、複数のポリアデニル化シグナルが3'-非コード領域内に存在することを明らかにした。それゆえ、より小さな大きさのmRNAは、他のZHX3関連のmRNAの存在よりもむしろ単一の遺伝子からの異なるポリアデニル化シグナルの使用により産生されうるようである。

#### 【0042】

ZHX3の全コード領域が上記GFPのC末端に融合されたとき、それは核内に局在した(図13)。ZHX3の2つのNLS、それぞれ1~107、及び497~555のアミノ酸配列があった。その一方で、上記GFPに融合されたZHX3の498~956のアミノ酸配列は細胞全体ではなく、核外に排他的に局在する。GFPのみ又はNLSを欠くGFP-ZHX1融合タンパク質は細胞全体に局在する(図13)。このことは、ZHX3の領域はNESを含むことを示す。それゆえ、ZHX3は1つの分子内に2つのNLS及び1つのNESを含む

、より複雑なタンパク質である。ZHX1を含む多くの他のタンパク質においては、上記NLSは塩基アミノ酸残基のクラスターにマッピングされたことが報告されている（非特許文献4等）。この領域はインボルチン $\alpha$ の如き、核輸入タンパク質と関連し、そしてそれから細胞質から核へ移行される（Kaffman, A., and O'Shea, E. K. (1999) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15, 291-339）。しかしながら、ZHX3の2つのNLSは塩基性領域には局在せず、そして以前に報告されたNESとは相同性を示さないので、ZHX3は核へ移行されるための他の分子と関連しうる。

【0043】

# SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 転写制御因子 ZHX3

<130> PS02-1225

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 956

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Lys Arg Lys Ser Thr Thr Pro Cys Met Ile Pro Val Lys

1 5 10 15

Thr Val Val Leu Gln Asp Ala Ser Met Glu Ala Gln Pro Ala Glu Thr

20 25 30

Leu Pro Glu Gly Pro Gln Gln Asp Leu Pro Pro Glu Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Ser Ser Glu Ala Ala Gln Asn Pro Ser Ser Thr Asp Gly Ser Thr Leu

50 55 60

Ala Asn Gly His Arg Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Leu Tyr Ser Cys Lys

65	70	75	80
Tyr Cys Asp Phe Arg Ser His Asp Met Thr Gln Phe Val Gly His Met			
	85	90	95
Asn Ser Glu His Thr Asp Phe Asn Lys Asp Pro Thr Phe Val Cys Ser			
	100	105	110
Gly Cys Ser Phe Leu Ala Lys Thr Pro Glu Gly Leu Ser Leu His Asn			
	115	120	125
Ala Thr Cys His Ser Gly Glu Ala Ser Phe Val Trp Asn Val Ala Lys			
	130	135	140
Pro Asp Asn His Val Val Val Glu Gln Ser Ile Pro Glu Ser Thr Ser			
145	150	155	160
Thr Pro Asp Leu Ala Gly Glu Pro Ser Ala Glu Gly Ala Asp Gly Gln			
	165	170	175
Ala Glu Ile Ile Ile Thr Lys Thr Pro Ile Met Lys Ile Met Lys Gly			
	180	185	190
Lys Ala Glu Ala Lys Lys Ile His Thr Leu Lys Glu Asn Val Pro Ser			
	195	200	205
Gln Pro Val Gly Glu Ala Leu Pro Lys Leu Ser Thr Gly Glu Met Glu			
	210	215	220
Val Arg Glu Gly Asp His Ser Phe Ile Asn Gly Ala Val Pro Val Ser			
225	230	235	240
Gln Ala Ser Ala Ser Ser Ala Lys Asn Pro His Ala Ala Asn Gly Pro			
	245	250	255
Leu Ile Gly Thr Val Pro Val Leu Pro Ala Gly Ile Ala Gln Phe Leu			
	260	265	270
Ser Leu Gln Gln Gln Pro Pro Val His Ala Gln His His Val His Gln			
	275	280	285
Pro Leu Pro Thr Ala Lys Ala Leu Pro Lys Val Met Ile Pro Leu Ser			
	290	295	300

Ser Ile Pro Thr Tyr Asn Ala Ala Met Asp Ser Asn Ser Phe Leu Lys  
305 310 315 320  
Asn Ser Phe His Lys Phe Pro Tyr Pro Thr Lys Ala Glu Leu Cys Tyr  
325 330 335  
Leu Thr Val Val Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Gln Leu Lys Ile Trp Phe  
340 345 350  
Thr Ala Gln Arg Leu Lys Gln Gly Ile Ser Trp Ser Pro Glu Glu Ile  
355 360 365  
Glu Asp Ala Arg Lys Lys Met Phe Asn Thr Val Ile Gln Ser Val Pro  
370 375 380  
Gln Pro Thr Ile Thr Val Leu Asn Thr Pro Leu Val Ala Ser Ala Gly  
385 390 395 400  
Asn Val Gln His Leu Ile Gln Ala Ala Leu Pro Gly His Val Val Gly  
405 410 415  
Gln Pro Glu Gly Thr Gly Gly Gly Leu Leu Val Thr Gln Pro Leu Met  
420 425 430  
Ala Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Val Thr  
435 440 445  
Ser Val Pro Lys Gln Pro Gly Val Ala Pro Ile Asn Thr Val Cys Ser  
450 455 460  
Asn Thr Thr Ser Ala Val Lys Val Val Asn Ala Ala Gln Ser Leu Leu  
465 470 475 480  
Thr Ala Cys Pro Ser Ile Thr Ser Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ser Ile  
485 490 495  
Tyr Lys Asn Lys Lys Ser His Glu Gln Leu Ser Ala Leu Lys Gly Ser  
500 505 510  
Phe Cys Arg Asn Gln Phe Pro Gly Gln Ser Glu Val Glu His Leu Thr  
515 520 525  
Lys Val Thr Gly Leu Ser Thr Arg Glu Val Arg Lys Trp Phe Ser Asp



530                      535                      540  
Arg Arg Tyr His Cys Arg Asn Leu Lys Gly Ser Arg Ala Met Ile Pro  
545                      550                      555                      560  
Gly Asp His Ser Ser Ile Ile Ile Asp Ser Val Pro Glu Val Ser Phe  
                         565                      570                      575  
Ser Pro Ser Ser Lys Val Pro Glu Val Thr Cys Ile Pro Thr Thr Ala  
                         580                      585                      590  
Thr Leu Ala Thr His Pro Ser Ala Lys Arg Gln Ser Trp His Gln Thr  
                         595                      600                      605  
Pro Asp Phe Thr Pro Thr Lys Tyr Lys Glu Arg Ala Pro Glu Gln Leu  
610                      615                      620  
Arg Ala Leu Glu Ser Ser Phe Ala Gln Asn Pro Leu Pro Leu Asp Glu  
625                      630                      635                      640  
Glu Leu Asp Arg Leu Arg Ser Glu Thr Lys Met Thr Arg Arg Glu Ile  
                         645                      650                      655  
Asp Ser Trp Phe Ser Glu Arg Arg Lys Lys Val Asn Ala Glu Glu Thr  
                         660                      665                      670  
Lys Lys Ala Glu Glu Asn Ala Ser Gln Glu Glu Glu Glu Ala Ala Glu  
                         675                      680                      685  
Asp Glu Gly Gly Glu Glu Asp Leu Ala Ser Glu Leu Arg Val Ser Gly  
690                      695                      700  
Glu Asn Gly Ser Leu Glu Met Pro Ser Ser His Ile Leu Ala Glu Arg  
705                      710                      715                      720  
Lys Val Ser Pro Ile Lys Ile Asn Leu Lys Asn Leu Arg Val Thr Glu  
                         725                      730                      735  
Ala Asn Gly Arg Asn Glu Ile Pro Gly Leu Gly Ala Cys Asp Pro Glu  
                         740                      745                      750  
Asp Asp Glu Ser Asn Lys Leu Ala Glu Gln Leu Pro Gly Lys Val Ser  
755                      760                      765

Cys Lys Lys Thr Ala Gln Gln Arg His Leu Leu Arg Gln Leu Phe Val  
 770 775 780  
 Gln Thr Gln Trp Pro Ser Asn Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Met Ala Gln  
 785 790 795 800  
 Thr Gly Leu Pro Arg Pro Glu Val Val Arg Trp Phe Gly Asp Ser Arg  
 805 810 815  
 Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Gln Leu Lys Trp Tyr Glu Asp Tyr Lys Arg  
 820 825 830  
 Gly Asn Phe Pro Pro Gly Leu Leu Val Ile Ala Pro Gly Asn Arg Glu  
 835 840 845  
 Leu Leu Gln Asp Tyr Tyr Met Thr His Lys Met Leu Tyr Glu Glu Asp  
 850 855 860  
 Leu Gln Asn Leu Cys Asp Lys Thr Gln Met Ser Ser Gln Gln Val Lys  
 865 870 875 880  
 Gln Trp Phe Ala Glu Lys Met Gly Glu Glu Thr Arg Ala Val Ala Asp  
 885 890 895  
 Thr Gly Ser Glu Asp Gln Gly Pro Gly Thr Gly Glu Leu Thr Ala Val  
 900 905 910  
 His Lys Gly Met Gly Asp Thr Tyr Ser Glu Val Ser Glu Asn Ser Glu  
 915 920 925  
 Ser Trp Glu Pro Arg Val Pro Glu Ala Ser Ser Glu Pro Phe Asp Thr  
 930 935 940  
 Ser Ser Pro Gln Ala Gly Arg Gln Leu Glu Thr Asp  
 945 950 955

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 522

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 2

Cys Ser Phe Leu Ala Lys Thr Pro Glu Gly Leu Ser Leu His Asn Ala  
 1                      5                      10                      15  
 Lys Cys His Ser Gly Glu Ala Ser Phe Leu Trp Asn Val Thr Lys Pro  
                     20                      25                      30  
 Asp Asn His Val Val Val Glu Gln Ser Val Pro Glu Asn Ala Ser Ser  
                     35                      40                      45  
 Ser Val Leu Ala Gly Glu Ser Thr Glu Gly Thr Glu Ile Ile Ile Thr  
                     50                      55                      60  
 Lys Thr Pro Ile Met Lys Ile Met Lys Gly Lys Ala Glu Ala Lys Lys  
 65                      70                      75                      80  
 Ile His Met Leu Lys Glu Asn Ala Pro Thr Gln Pro Gly Gly Glu Ala  
                     85                      90                      95  
 Leu Pro Lys Pro Leu Ala Gly Glu Thr Glu Gly Lys Glu Gly Asp His  
                     100                      105                      110  
 Thr Phe Ile Asn Gly Ala Thr Pro Val Ser Gln Ala Ser Ala Asn Ser  
                     115                      120                      125  
 Thr Lys Pro Pro His Thr Ala Asn Gly Pro Leu Ile Gly Thr Val Pro  
                     130                      135                      140  
 Val Leu Pro Ala Gly Ile Ala Gln Phe Leu Ser Leu Gln Gln Pro Thr  
 145                      150                      155                      160  
 Val His Pro Gln His His Pro His Gln Pro Leu Pro Thr Ser Lys Ala  
                     165                      170                      175  
 Leu Pro Lys Val Met Ile Pro Leu Ser Ser Ile Pro Thr Tyr Asn Ala  
                     180                      185                      190  
 Ala Met Asp Ser Asn Ser Phe Leu Lys Asn Ser Phe His Lys Phe Pro  
                     195                      200                      205  
 Tyr Pro Thr Lys Ala Glu Leu Cys Tyr Leu Thr Val Val Thr Lys Tyr  
                     210                      215                      220  
 Pro Glu Glu Gln Leu Lys Ile Trp Phe Thr Ala Gln Arg Leu Lys Gln

225                      230                      235                      240  
Gly Ile Ser Trp Ser Pro Glu Glu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Lys Met  
                         245                      250                      255  
Phe Asn Thr Val Ile Gln Ser Val Pro Gln Pro Thr Ile Thr Val Leu  
                         260                      265                      270  
Asn Thr Pro Leu Val Ala Ser Ala Gly Asn Val Gln His Leu Ile Gln  
                         275                      280                      285  
Ala Ala Leu Pro Gly His Ala Val Gly Gln Pro Glu Gly Thr Ala Gly  
                         290                      295                      300  
Gly Leu Leu Val Thr Gln Pro Leu Met Ala Asn Gly Leu Gln Ala Ser  
305                      310                      315                      320  
Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val Pro Lys Pro Thr Ala  
                         325                      330                      335  
Ala Pro Ile Asn Thr Val Cys Ser Asn Thr Thr Ser Ala Val Lys Val  
                         340                      345                      350  
Val Asn Ala Ala Gln Ser Leu Leu Thr Ala Cys Pro Ser Ile Thr Ser  
                         355                      360                      365  
Gln Ala Phe Leu Asp Ala Asn Ile Tyr Lys Asn Lys Lys Ser His Glu  
                         370                      375                      380  
Gln Leu Ser Ala Leu Lys Gly Ser Phe Cys Arg Asn Gln Phe Pro Gly  
385                      390                      395                      400  
Gln Ser Glu Val Glu His Leu Thr Lys Val Thr Gly Leu Ser Thr Arg  
                         405                      410                      415  
Glu Val Arg Lys Trp Phe Ser Asp Arg Arg Tyr His Cys Arg Asn Leu  
                         420                      425                      430  
Lys Gly Thr Arg Ala Met Val Pro Gly Glu His Gly Ser Val Leu Ile  
                         435                      440                      445  
Asp Ser Val Pro Glu Val Pro Phe Pro Leu Ser Ser Lys Val Pro Glu  
                         450                      455                      460

Val Pro Cys Val Pro Thr Ala Thr Ser Leu Val Ser His Pro Ala Thr  
465 470 475 480

Lys Arg Gln Ser Trp His Gln Thr Pro Asp Phe Thr Pro Thr Lys Tyr  
485 490 495

Lys Glu Arg Ala Pro Glu Gln Leu Arg Val Leu Glu Ser Ser Phe Ala  
500 505 510

Gln Asn Pro Leu Pro Pro Glu Glu Glu Leu  
515 520

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 3

agcttcccgga attctgcag 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 4

tcgactgcag aattcggga 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 5

gtggcagaca caggcagtg 19

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 6

ggccggatcc cagactggcc agtcc

25

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 7

cctgagcagc attccaacg

19

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 8

cttcttggtc tcctcagcat tcac

24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 9

gtgattgtca ccatggccag

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 10

gaaggagttc ttcaggaagc

20

<210> 11

<211> 30

<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 11  
ccgggaattc ctgagcagca ttccaacgta 30  
<210> 12  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 12  
ccggggatcc agcccttcaa gttccggc 28  
<210> 13  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 13  
ccggggatcc agatttctta tttttgtaga tgc 33  
<210> 14  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 14  
ccgggaattc tcccctgagg agattgagg 29  
<210> 15  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 15  
ccgggaattc tacaaaaata agaaatctca tgaac 35  
<210> 16

<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 16  
ccggggatcc ggaccagctg atcccctg 28  
<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 17  
gtgggctgag gcacagactg 20  
<210> 18  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 18  
ccaatcatga agataatgaa aggc 24  
<210> 19  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 19  
aattcccggg 10  
<210> 20  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 20  
gatcccggg 9



<210> 21  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 21  
tatggaattc gc 12  
<210> 22  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 22  
catggcgaat tcca 14  
<210> 23  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 23  
ccgggaattc ggaccagctg atcccctg 28  
<210> 24  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 24  
ccgggaattc atggccagca agaggaaatc 30  
<210> 25  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 25

ccgggggatcc caggggggatc atcactttg 29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 26

ccgggggatcc tggcttggcc acgttccac 29

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 27

ccgggggatcc tggcttggcc acgttccac 29

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 28

ccgggggatcc tgggtcttta ttaaagtctg tg 32

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 29

ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg 30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 30  
ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg 30  
<210> 31  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 31  
ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg 30  
<210> 32  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 32  
ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg 30  
<210> 33  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 33  
aattccacca cactggatcc ctggtac 27  
<210> 34  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<400> 34  
ggcatcttgc aacaccacag tcttc 25  
<210> 35  
<211> 25  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 35

catgcatggt gtggtggatt tcctc

25

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒト ZHX3 の推測されるアミノ酸配列のヒト ZHX1 との比較を示す図である。ZHX3 及び ZHX1 のアミノ酸配列を比較する。2つの Zn f モチーフ及び 5つの HD をそれぞれプラスの印及び下線で示す。アスタリスクはアミノ酸同一性を示す。破線はそれぞれのタンパク質に対応するアミノ酸配列が存在しないときのギャップを示す。それぞれ、114～642、242～615、及び 495～956 のヒト ZHX3 のアミノ酸配列に対応する、クローン G58 及び G23、並びに KIAA0395 の推測されるアミノ酸配列を示す。

【図 2】

ヒト ZHX3 mRNA の組織分布を示す図である。それぞれのレーンは、示された組織から単離された 2  $\mu$ g のポリ A<sup>+</sup>-RNA を含む。サイズマーカーは kb で左側に示す。レーン 1、心臓；レーン 2、脳；レーン 3、胎盤；レーン 4、肺；レーン 5、肝臓；レーン 6、骨格筋；レーン 7、腎臓；レーン 8、脾臓；レーン 9、脾臓；レーン 10、胸腺；レーン 11、前立腺；レーン 12、精巣；レーン 13、卵巣；レーン 14、小腸；レーン 15、結腸；レーン 16、白血球。

【図 3】

酵母 2-ハイブリッドシステム又は GST プルダウン分析を用いた、ZHX1 及び ZHX3 間の最小ヘテロ二量体化ドメインの同定を示す図である。ヒト ZHX1 及び GAL4 AD-ZHX1 融合構築物の図解表示は左側に示す。Zn f 及び HD はそれぞれ、ジンクフィンガーモチーフ及びホメオドメインを示す。+ 及び - のシンボルは、GAL4 DBD に融合したヒト ZHX3 の 242～488 のアミノ酸配列を発現する、pDBD-G23、及び pACT2 の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

【図 4】

酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間の最小ヘテロ二量体化ドメインの同定を示す図である。ヒトZHX3及びGAL4 AD-ZHX3融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf、HD、及びEは、それぞれ、ジンクフィンガーモチーフ、ホメオドメイン、及びグルタミン酸リッチ領域を示す。+及び-のシンボルは、GAL4 DBDに融合したヒトZHX1の全コード領域を発現する、pDBD-ZHX1 (1-873)、及びpACT2の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

#### 【図5】

酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間の最小ヘテロ二量体化ドメインの同定を示す図である。GSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間のin vitroのヘテロ二量体化。in vitroで翻訳された<sup>35</sup>S-標識された、全長ヒトZHX1又はZHX3を、結合したGSTのみ（レーン1、5、及び8）及びGSTに融合したZHX3の242～615のアミノ酸配列（レーン3）、ヒトZHX3（レーン6）又はヒトZHX1（レーン9）タンパク質の全コード配列を含むセファロースビーズとインキュベートした。上記ビーズを激しく洗浄し、そして結合したタンパク質を溶出し、そして10%SDS-PAGEにより分析した。相互作用シグナルはオートラジオグラフィーにより検出された。レーン2、4、及び7、他のレーンで示される上記反応に添加されたタンパク質の10%がのせられた。

#### 【図6】

酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX3の最小ホモ二量体化ドメインの同定を示す図である。ヒトZHX3及びGAL4 AD-ZHX3融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf、HD、及びEは、それぞれ、ジンクフィンガーモチーフ、ホメオドメイン、及びグルタミン酸リッチ領域を示す。+及び-のシンボルは図3についての説明において示すものと同じものを示す。

#### 【図7】

酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX3の

最小ホモ二量体化ドメインの同定を示す図である。GSTプルダウン分析を用いた、ZHX3のin vitroのホモ二量体化。in vitroで翻訳された、<sup>35</sup>S-標識された、全長ヒトZHX3を、結合したGSTのみ（レーン2）又はGSTに融合したヒトZHX3タンパク質の全コード配列（レーン3）を含むセファロースビーズとインキュベートした。続く手順は図5についての説明において示されたものと同じである。レーン1、他のレーンで示される上記反応に添加されたタンパク質の10%がのせられた。

#### 【図8】

酵母2-ハイブリッドシステムを用いたNF-YA及びZHX3間の相互作用ドメインのマッピングを示す図である。ヒトZHX3及びGAL4 AD-ZHX3融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf、HD、及びEは、それぞれ、ジンクフィンガーモチーフ、ホメオドメイン、及びグルタミン酸-リッチ領域を示す。+及び-のシンボルは、GAL4 DBDに融合したNF-YAの活性化ドメインを発現する、pYA1-269、及びpACT2の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

#### 【図9】

酵母2-ハイブリッドシステムを用いたNF-YA及びZHX3間の相互作用ドメインのマッピングを示す図である。NF-YA及びGAL4 DBDに融合したその欠失変異体の図解表示は左側に示す。Q及びS/Tは、それぞれ、グルタミン-リッチ及びセリン/スレオニン-リッチ領域を示す。SID及びDBDは、それぞれ、サブユニット相互作用及びDNA結合ドメインを示す。+及び-のシンボルは、pDBD及び、GAL4 ADに融合したヒトZHX3の242～488のアミノ酸配列を発現する、pAD-ZHX3（242-488）の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

#### 【図10】

ZHX3は転写リプレッサーであることを示す図である。HEK293細胞を2 ngのpRL-CMV、50 ngの（カラム上に示す）SV40プロモーターダ

イレクティッド発現ベクター、及び100 ngの5×GAL4-pGL3 Control又はpGL3-Controlレポータープラスミドで共トランスフェクトした。pSG424及びpGAL4-ZHX3(1-956)は、それぞれ、GAL4 DBDのみ及びGAL4 DBDに融合したヒトZHX3の全コード配列を発現する。100%の値は、それぞれ、50 ngのpSG424の存在下におけるレポータープラスミドについてのプロモーター活性に示された。

【図11】

ZHX3は転写リプレッサーであることを示す図である。HEK293細胞を2 ngのpRL-CMV、50 ngの(カラム上に示す)SV40プロモーターイレクティッド発現ベクター、100 ngの5×GAL4-pGL3 Controlレポータープラスミド、示された量のpCMV-ZHX1(242-432)発現プラスミドで共トランスフェクトした。プラスミド(202 ng)の総量は、必要であれば、pcDNA3.1His-C2の添加により調節された。100%の値は、50 ngのpSG424及び50 ngのpcDNA3.1His-C2の存在下におけるレポータープラスミドのプロモーター活性に示された。トランスフェクション48時間後、上記細胞を回収し、そしてホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ活性を決定した。ホタルルシフェラーゼ活性は全ての実験においてウミシイタケルシフェラーゼ活性により正規化された。それぞれのカラム及び棒は少なくとも5のトランスフェクション実験の平均及び標準偏差を示す。

【図12】

ZHX3の最小リプレッサードメインの決定を示す図である。pSG424及びさまざまなpGAL4-ZHX3構築物は、それぞれ、GAL4 DBDのみ及びGAL4 DBDに融合したヒトZHX3のさまざまな欠失変異体を発現する。条件は図10についての説明において示されたものと同じである。それぞれのカラム及び棒は少なくとも5のトランスフェクション実験の平均及び標準偏差を示す。

【図13】

HEK293細胞におけるZHX3の細胞内局在及び核移行シグナルの決定を示

す図である。GFPのみ又はGFPのC末端に融合されたさまざまな切断されたZHX3タンパク質をコードする、発現プラスミド(300ng)をHEK293細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後、GFP融合タンパク質の細胞内局在を観察した。構築物はそれぞれのパネルの上部に示す。

【図14】

ZHX3の機能ドメインを示す図である。Znf、ジンクフィンガーモチーフ；HD、ホメオドメイン；E、グルタミン酸-リッチ領域；DD、二量体化ドメイン；ID、NF-YAとの相互作用ドメイン；RD、リプレッサードメイン；NLS、核移行シグナル。



【書類名】 図面

【図 1】

ZHX3 1:MASKRKSTTPCMIPVKTIVLQDASMEAQPAETLPEGPOODLPPEASAAASSEAAQNPSSTD 60  
ZHX1 1:MASRRKSTTPCMV-L-ASE-QDDPLE-LISD-LDEGP-PVLTVENTRAESISSDEEVHE 54  
\*\*\* \*\*\*\*\*

ZHX3 61:GSTLANGHRSTLDGYLYSCKYCDFRSHDMTQFVGHMNSEHTDFNKDPTFVCSGCSFLAKT 120  
ZHX1 55:SVSDSNQONKKVEG-GYECKYCTFQTPDLNMFTHVDSEHPNVVLNSSYVCVECNFLTKR 113  
\*\*\*\*\*

ZHX3 121:PEGLSLHNATCHSGEASVWVNVAKPDNHVVVEQSIPESTSTPDLAGEPSAEGADGOAEII 180  
ZHX1 114:YDALSEHNLYHPGEENFKLTMVKRNNQTFEQITINDLTFDGSFVKEENAEQAES-TEVS 172  
\*\*\*\*\*

ZHX3 181:ITKTPIMKIMKGAEAKKIHTLKENVPSQPVGEALPKLSTGEMEVREGDHSFINGAVPVS 240  
ZHX1 173:SSGISISKTPIMKMMKNKVENKRIAVHNSV-EDVPE-EK-ENEIKPDREEIVENPSSA 229  
\*\*\*

ZHX3 241:QASASSAKNPHAANGPLIGTVPVLPAGIAQFSLQOQPPVHAQHVVHQPPLTAKALPKVM 300  
ZHX1 230:SESNTSTSVNRHPSTASTV-VTPAAVLPGA-QVITAVSAQONS--L-----IPKVL 280  
\*\*\*

ZHX3 301:IPLSSSIPTYNAAMDSNSFLKNSFHKFPYPTKAEILCYLTVVTKYPEEOLKIWFSTAORLKOG 360  
ZHX1 281:IPVNSIPTYNALDNNPLLLNTYNKFFPYPTMSEITVLSAQAKYTEEQIKIWFSAORLKHG 340  
\*\*\*

ZHX3 361:ISWSPEEIEDARKKMFNTVIOVPOPTITVLNTPLVASAGNVQHLIOAALPGHVVGOPPEG 420  
ZHX1 341:VSWTPEEVEEARRKQFNGTVHTVPO-TITVIPHTISTGSNGLPSILOTC---QIVGQP-- 394  
\*\*\*

ZHX3 421:TGGGLLVTOPLMANGLOATSSPLPLTVTSVPKQPGVAPINTVCSNTTSAVKVNVAAQSL 480  
ZHX1 395:---GLVLTOVAGTNTLPVT-APIALTAVAGVPSQNNIQKSQVPAQAQPTAETKPATAAVPTS 450  
\*\*\*

ZHX3 481:TACPSITSQAFLDASIYKNKKSHEOLSALKGSFCRNOPGPOSEVEHLTKVTGLSTREVRK 540  
ZHX1 451:QSVKHETALVNPDSFGIRAKKTKEOLAEKVSYLKNOPPHDSEIIRLMKITGLTKGEIKK 510  
\*\*\*

ZHX3 541:WFSDDRRYHCRNLKGSRAMIPGDHSSIIIDSVPVFSFSPSSKVPEVTCIPTTATLATHPSA 600  
ZHX1 511:WFSDDRYNQRNSKSNQCLHLNNDSSSTI--I--ID-S-SDETTE-S--PTVGT-A-QP-- 557  
\*\*\*\*\*

ZHX3 601:KRQSWHQPDPFTPTKYKERAPEOLRALESSFAONPLPLDEELDRLRSETKMTTRREIDSWF 660  
ZHX1 558:K-QSWNPFDPFTPOKFKEKTAEOLRVLOASFLNSSVLDEELNRLRAOTKLTRREIDAWF 616  
\*\*\*

ZHX3 661:SERRKKVNAEETKKAENASQEEEEAAEDEGGEEDLASELRVSGENGSLEMPSSHILAER 720  
ZHX1 617:TE-KKKSKALKEEKMEID--ESNAGSSKEEAGETSPADE-SGAPKSGSTGKICKKT-PE- 670  
\*\*\*

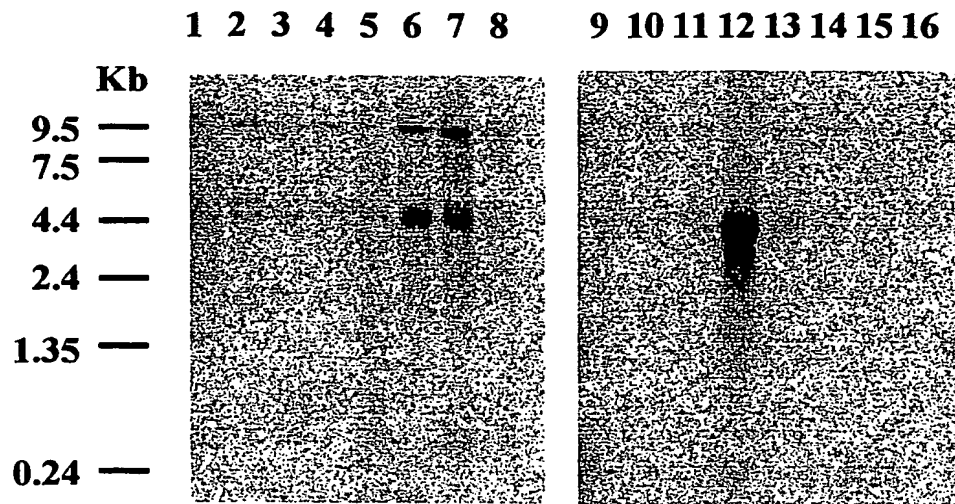
ZHX3 721:KVSPKINLKNLRVTEANGRNEIPGLGACDPEDDESINKLAEOLPGKVSCKKTAQORHLR 780  
ZHX1 671:OLHMLKSAF--VR-TOWPSPEEYDKLAK-ESGLARTD-IVSWF-GDTRYANK-NG-NLKW 722  
\*\*\*

ZHX3 781:OLFVOTOWPSNODYDSIMAOTGLPRPEVVRWFGDSRYALKNGOLKWYEDYKRGNFPPGLL 840  
ZHX1 723:YYYYQSANSSSMNGLSSLRKRGRGRPKGRGR-GRPR-GRPRGS-KRINNWDRG---PSLI 776  
\*\*\*

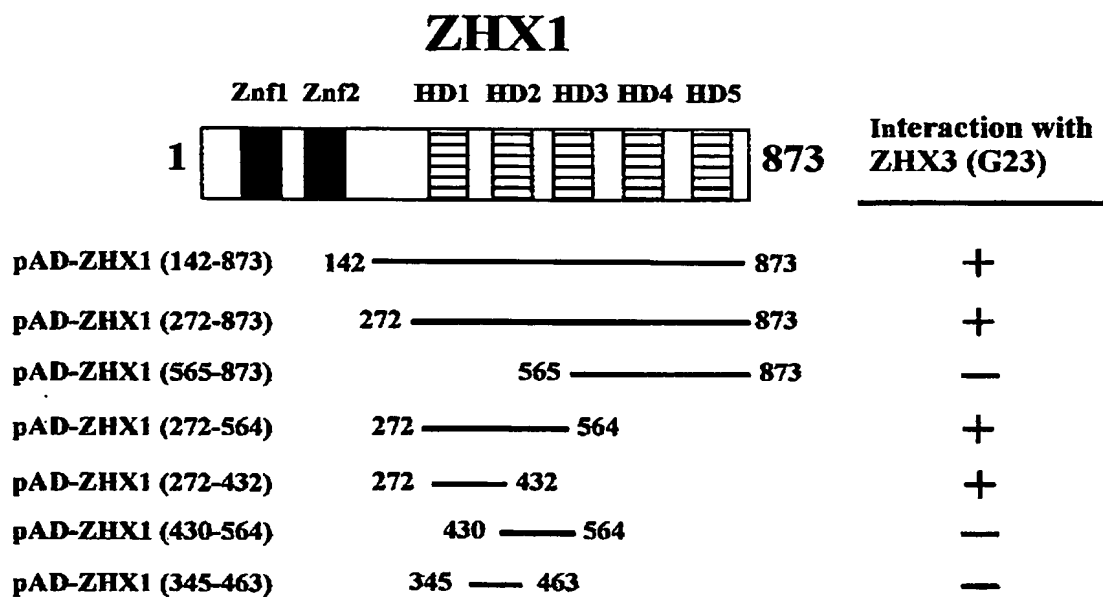
ZHX3 841:VIAPGNRELLODYMTHKMLYEEDLONLCDKTOMSSQOVKOWFAEKMGEETRAVADTGSE 900  
ZHX1 777:KFKTGT-ATLKDYLLKHKFLNEODLDELVNKSHMGYEOVREWFARORRSELGI-EL-FE 833  
\*\*\*

ZHX3 901:DOGPGETGELTAVHKMGMDTYSEVSENSESWEPVPEASSEPFDTSSPQAGRQLETD 956  
ZHX1 834:ENE-EDEV--ID-DQEED-EETDDSDTWEV--PRHVKKRLSKSDD 873  
\*\*\*

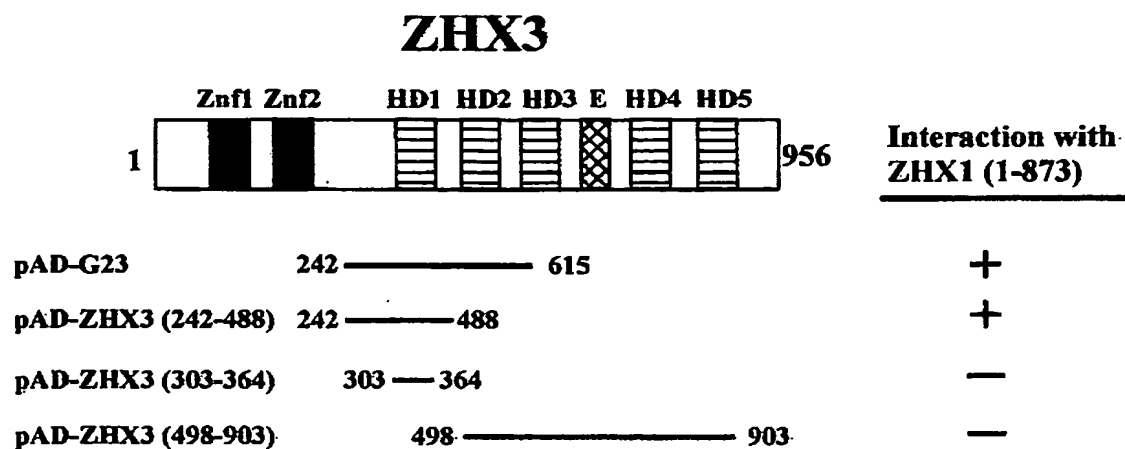
【図2】



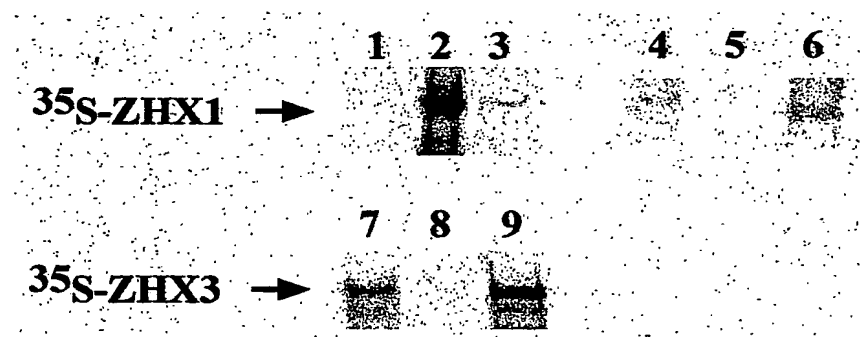
【図3】



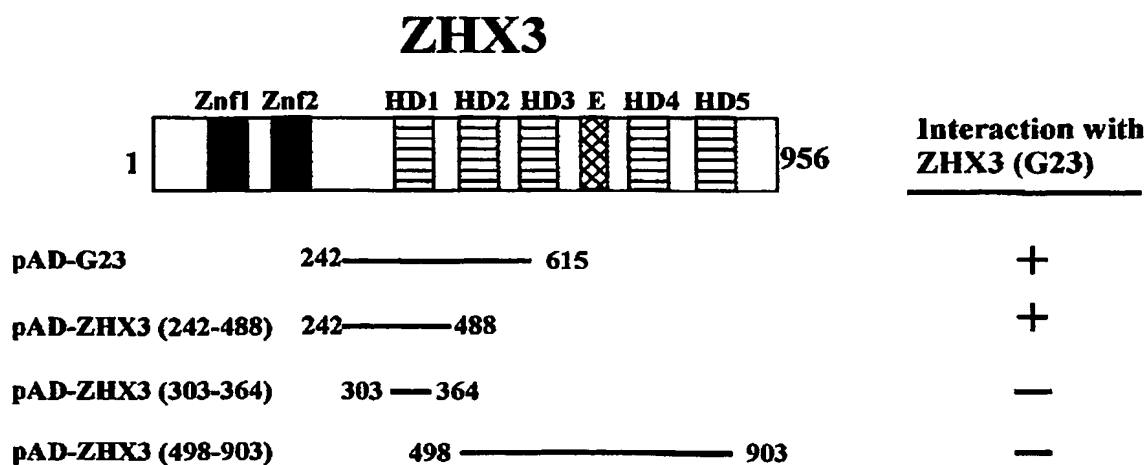
【図 4】



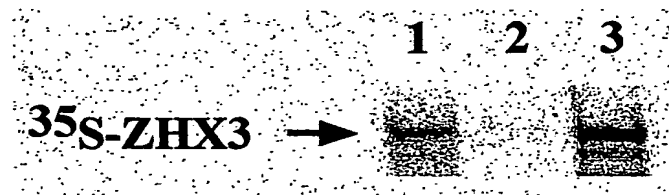
【図 5】



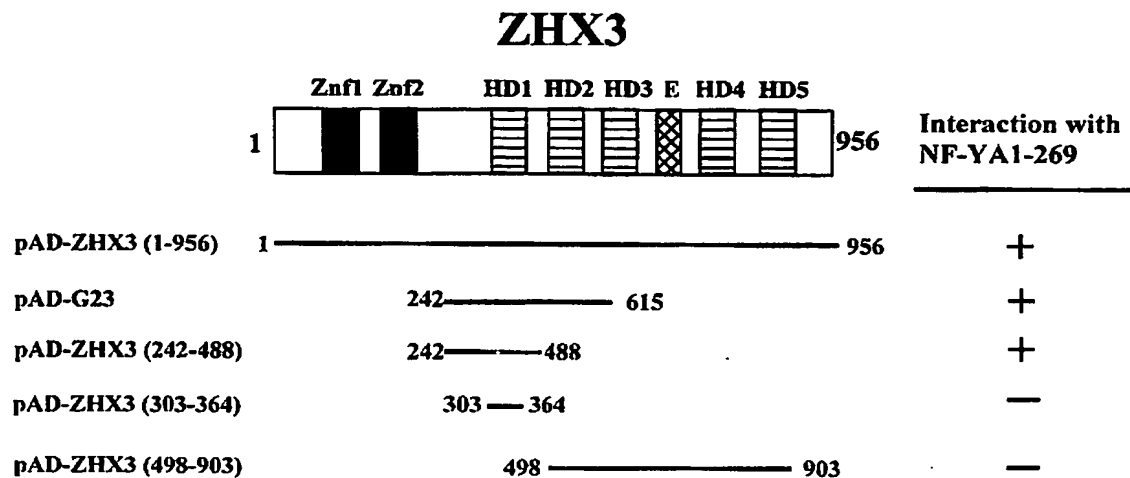
【図 6】



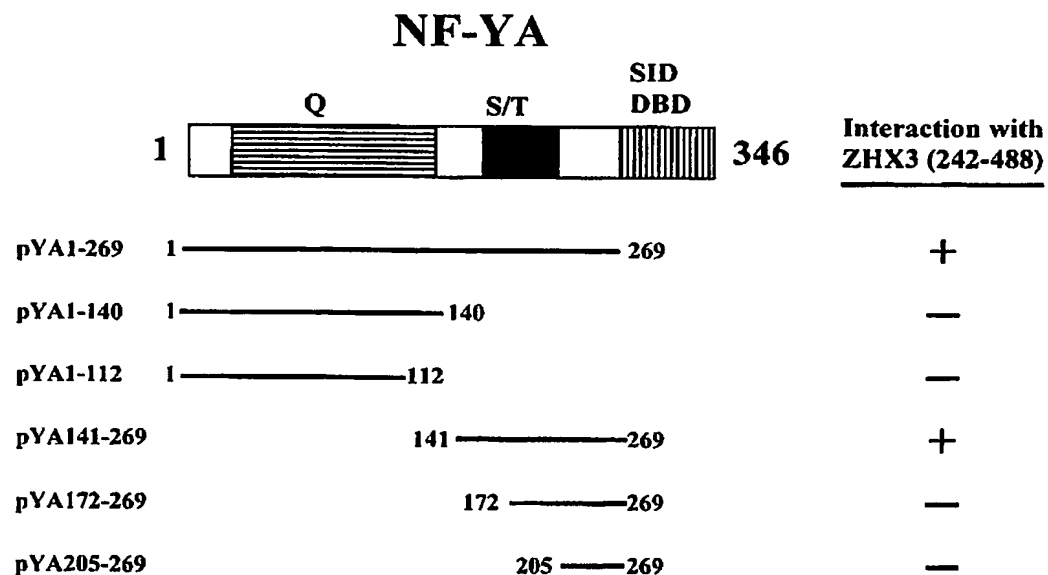
【図 7】



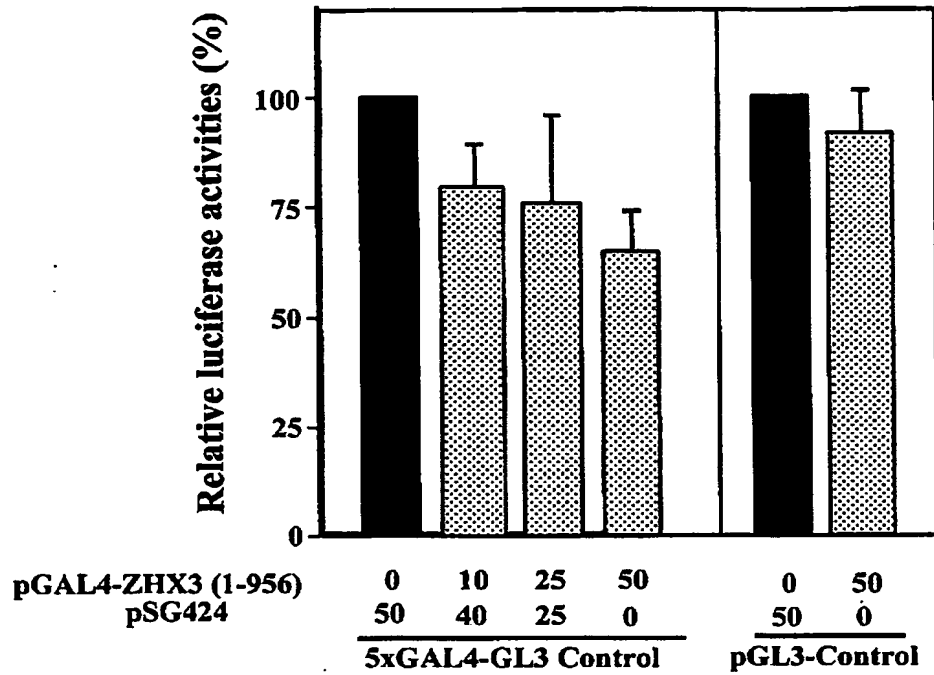
【図 8】



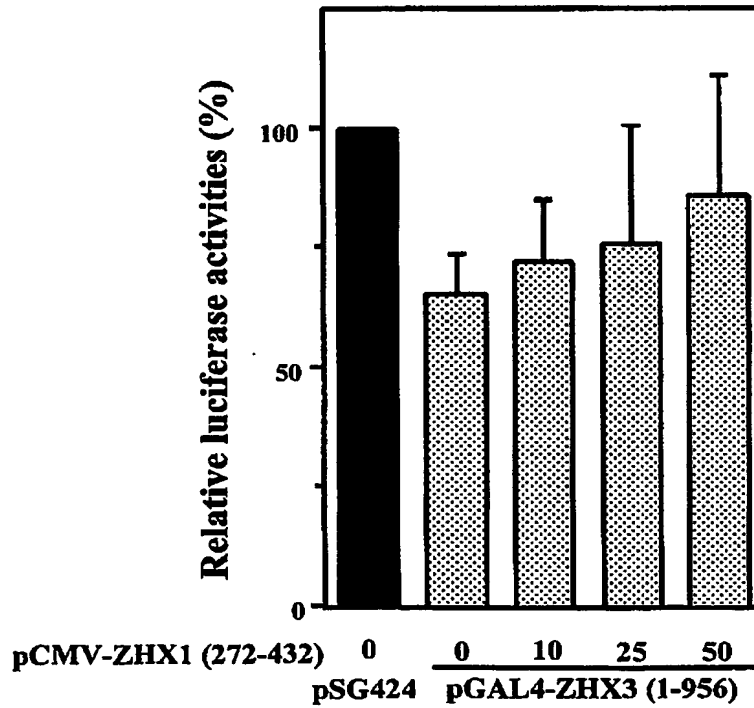
【図 9】



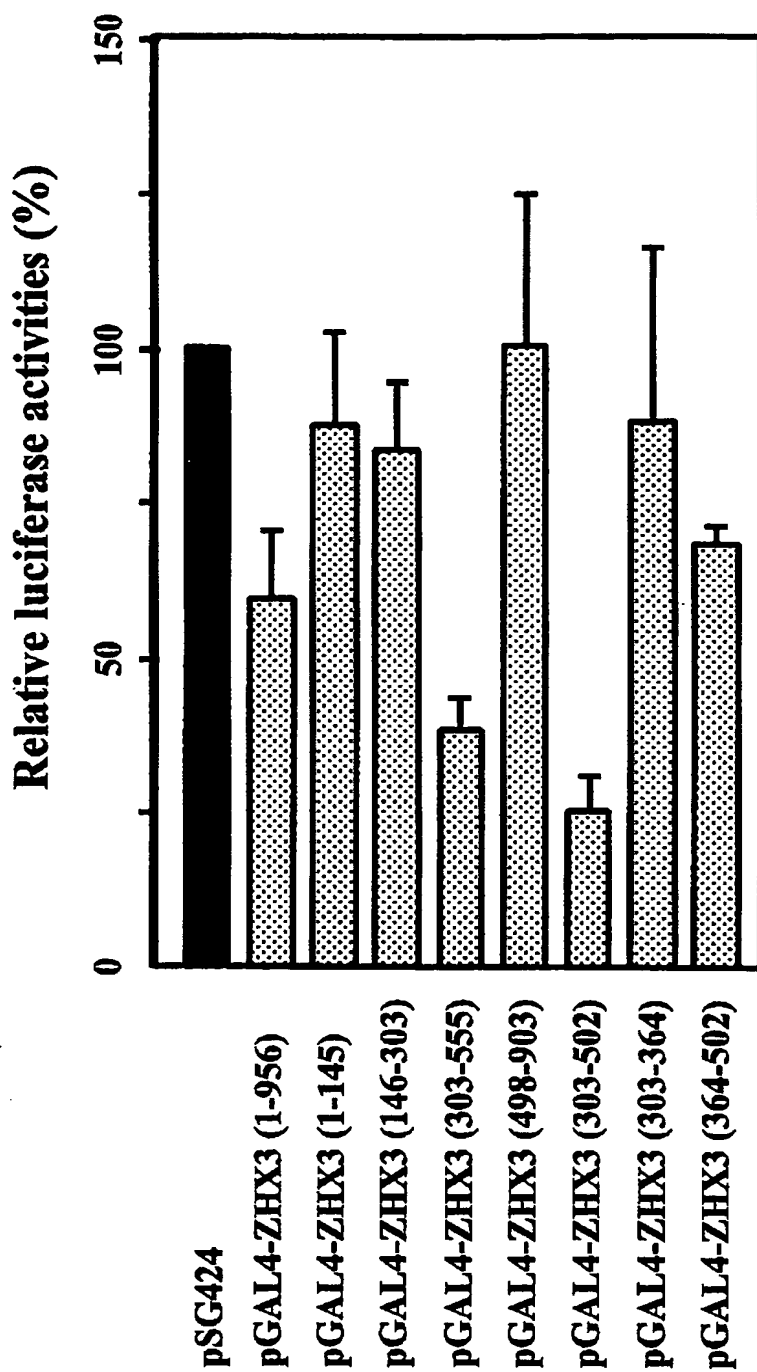
【図 10】



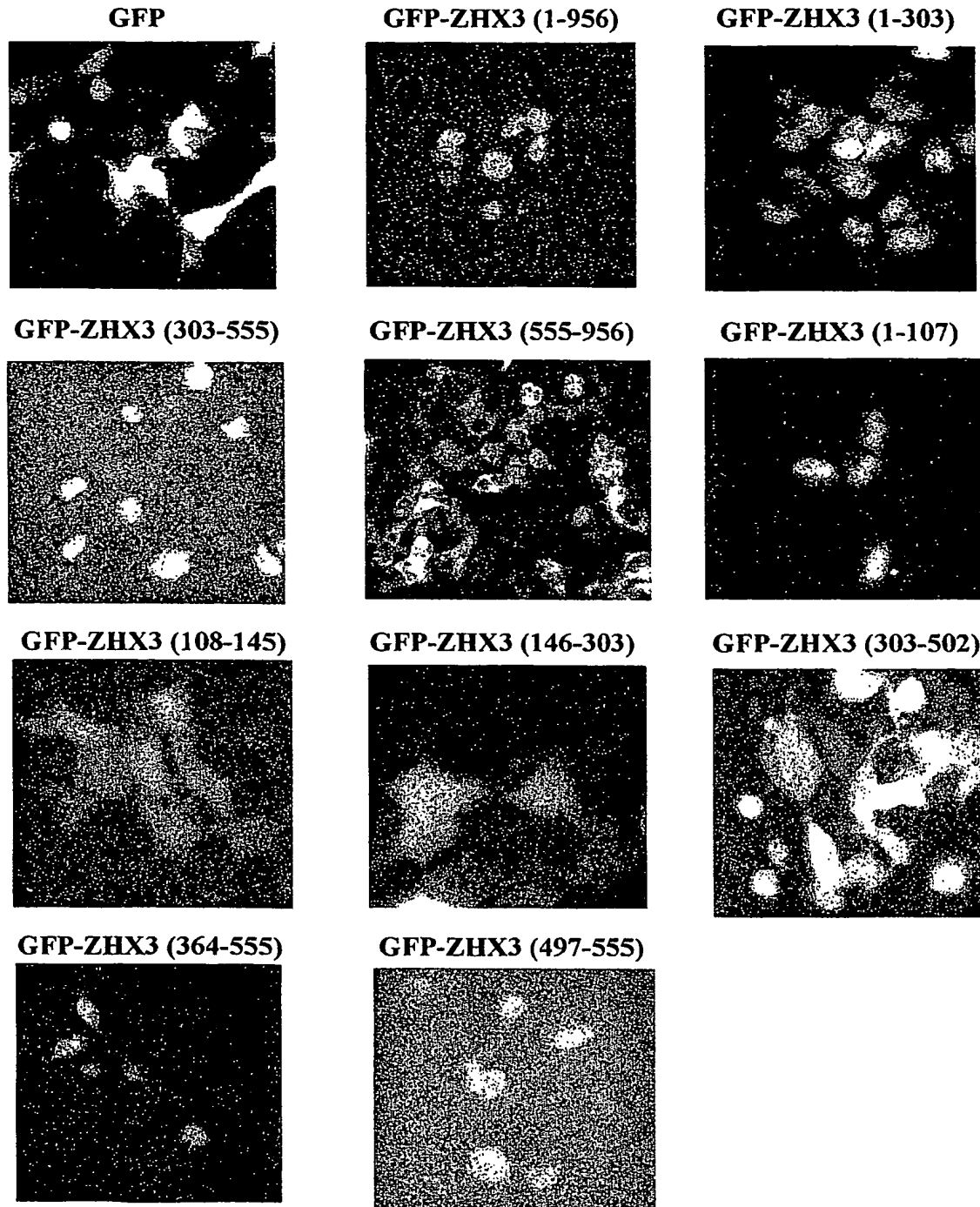
【図 11】



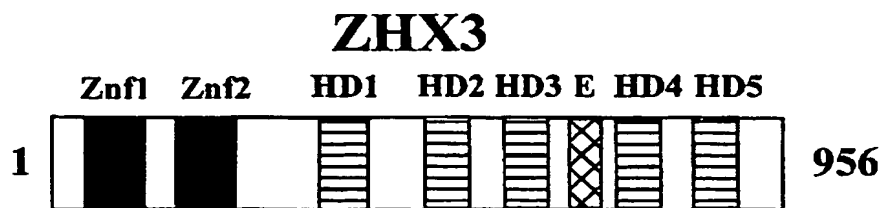
【図 12】



【図 13】



【図 14】



DD 242 — 488

ID 242 — 488

RD 303 — 502

NLS1 1 — 107

NLS2 497 — 555



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 発明者らが既に見出していた転写リプレッサーとして機能する ZHX1 の生物学的役割を決定するために、酵母 2-ハイブリッドシステムを用いて、ZHX1 と相互作用するタンパク質の探索を行った。

【解決手段】 その結果、新規なタンパク質をコードする全長 cDNA の分子クローニング及びヌクレオチド配列を決定したところ、配列番号 1 から成る新規なタンパク質が見出された。このタンパク質 (ZHX3) は、ZHX1 と同様に、2 つのジンクフィンガー (Znf) モチーフ及び 5 つのホメオドメイン (HDs) を含み、転写抑制活性を有することが明らかになった。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-366512
受付番号	50201916910
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年12月19日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年12月18日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-366512

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団